

Aus dem Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. G. Bein

des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg
in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. R. Karger, M. Sc.
Gerinnungsambulanz Duisburg

Einfluss einer kontrollierten Stabilisatorzuführung während der Spende auf die Lagerungseigenschaften leukozytendepletierten Vollblutes



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Christian Lukow
aus Hamburg

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 16.11.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Ralf Karger, M. Sc.

1. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Stief

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
I. Veröffentlichungen	9
II. Abkürzungen.....	11
III. Abbildungsverzeichnis.....	16
IV. Tabellenverzeichnis.....	18
1. Einleitung	21
1.1. Transfusionsmedizin	21
1.2. Lagerungsschaden.....	23
1.3. Erythrozyt.....	25
1.3.1. Erythrozytenaufbau	26
1.3.1.1. Lipiddoppelschicht	26
1.3.1.2. Membranskelett.....	28
1.3.2. Metabolismus der Erythrozyten	30
1.3.3. Hämoglobin und Sauerstoffbeladung.....	34
1.3.4. Rheologische Eigenschaften der Erythrozyten	38
1.3.4.1. Verformbarkeit.....	38
1.3.4.2. Aggregation.....	40
1.4. Mikrozirkulation und Blutströmung	42
2. Fragestellung	47
3. Material und Methoden	49
3.1. Studiengröße.....	50
3.2. Die Blutspender	50
3.3. Die Waagen.....	51
3.3.1. ABC [®] -MacoPharma-Waage.....	51
3.3.2. Compomixer M2 [®]	53
3.4. Das Beutelsystem.....	54

3.5.	Der Leukozytenfilter	55
3.6.	Die Blutentnahme.....	55
3.7.	Die Aufbereitung der Blutproben	56
3.8.	Die Untersuchungen	57
3.8.1.	Leukozytenzählung.....	57
3.8.2.	pH-Wert	59
3.8.3.	Glukose.....	59
3.8.4.	Laktat	60
3.8.5.	ATP	61
3.8.6.	2,3-DPG	63
3.8.7.	Hämatokrit und Hämoglobin.....	67
3.8.8.	Freies Hämoglobin und Hämolysate	68
3.8.9.	Kalium	70
3.9.	Gerinnung.....	71
3.9.1.	Gerinnungszeiten	71
3.9.2.	Faktor-V-Aktivität	72
3.9.3.	Faktor-VIII-Aktivität.....	73
3.9.4.	Fibrinogen (PT-derived)	74
3.9.5.	Antithrombin.....	74
3.9.6.	D-Dimere.....	75
3.9.7.	Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT-Komplexe)	76
3.10.	Rheologische Untersuchungen	80
3.10.1.	Messung der Erythrozytenverformbarkeit	80
3.10.2.	Messung der Erythrozytenaggregation	82
3.11.	Statistik	85
4.	Ergebnisse	86
4.1.	Blutspender.....	86
4.2.	Waagen und Blutkonserven	87

4.3.	Metabolismus	88
4.3.1.	pH-Wert	88
4.3.2.	Glukose.....	89
4.3.3.	Laktat	91
4.3.4.	ATP	92
4.3.5.	2,3-DPG	93
4.4.	Hämolyseparameter.....	95
4.4.1.	Freies Hämoglobin	95
4.4.2.	Hämolyserate	96
4.4.3.	Kalium	98
4.5.	Gerinnung.....	99
4.5.1.	Gerinnungszeiten	99
4.5.1.1.	Thrombinzeit (TT)	99
4.5.1.2.	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT).....	100
4.5.1.3.	Thromboplastinzeit (nach Quick)	102
4.5.2.	Faktor-V-Aktivität	103
4.5.3.	Faktor-VIII-Aktivität.....	104
4.5.4.	Fibrinogen (PT-derived)	105
4.5.5.	Antithrombin-Aktivität	107
4.5.6.	D-Dimere	108
4.5.7.	TAT-Komplexe.....	109
4.6.	Rheologische Untersuchungen	111
4.6.1.	Elongations-Index (Verformbarkeit)	111
4.6.2.	Aggregations-Index (Aggregation)	112
4.6.3.	$t_{1/2}$	113
4.7.	Übersicht Lagerungsparameter.....	115
5.	Diskussion	116
5.1.	Vollblutspende	116

5.2.	Leukozytenreduktion.....	118
5.3.	Metabolismus	120
5.3.1.	pH-Wert	120
5.3.2.	Glukose und Laktat	121
5.3.3.	ATP	123
5.3.4.	2,3-DPG	124
5.4.	Hämolytische Parameter.....	126
5.4.1.	Freies Hämoglobin und Hämolyserate	126
5.4.2.	Kalium	130
5.5.	Gerinnung.....	131
5.6.	Rheologische Eigenschaften	136
5.6.1.	Untersuchungsmethoden der Verformbarkeit.....	137
5.6.2.	Verformbarkeit.....	138
5.6.2.1.	Verformbarkeit und Volumen	139
5.6.2.2.	Verformbarkeit und Veränderungen an der Zellmembran	140
5.6.2.3.	Verformbarkeit und Vesikulation.....	142
5.6.2.4.	Verformbarkeit und oxidative Veränderungen	145
5.6.2.5.	Verformbarkeit und intrazelluläres Ca^{2+}	148
5.6.2.6.	Verformbarkeit und weitere Veränderungen an der Zellmembran.....	150
5.6.2.7.	Verformbarkeit und Membranfluktuationen.....	150
5.6.2.8.	Verformbarkeit und Formveränderungen der Erythrozyten	151
5.6.2.9.	Vergleich mit anderen Untersuchungsgruppen.....	152
5.6.2.10.	Einfluss von ATP auf die Verformbarkeit und die Form der Erythrozyten	156
5.6.3.	Verformbarkeit und Strömungsverhalten	159
5.6.3.1.	Krankheiten mit einer verminderten Verformbarkeit.....	163
5.6.4.	Aggregation.....	164
5.6.4.1.	Untersuchungsmethoden der Aggregation	164

5.6.4.2.	Aggregations-Index	165
5.6.4.3.	Aggregation und Lebensalter der Erythrozyten.....	166
5.6.4.4.	Aggregation und Fibrinogen	167
5.6.4.5.	Aggregation und Verformbarkeit	168
5.6.4.6.	Aggregation und Erythrozytenform	169
5.6.4.7.	Aggregation und oxidative Veränderungen	169
5.6.4.8.	Oberflächenladung der Erythrozyten	171
5.6.4.9.	Interindividuelle Unterschiede der Aggregation	171
5.6.4.10.	Aggregationsmodelle.....	172
5.6.5.	Aggregation und Strömungsverhalten	174
5.6.5.1.	Krankheiten mit erhöhter Aggregation	181
5.7.	Krankheitsstudien	182
5.8.	Suffiziente O ₂ -Versorgung durch Transfusionen?.....	186
5.9.	Immunologie	188
5.10.	Posttransfusionsüberleben	193
5.11.	ATP und NO.....	197
5.12.	Schlussfolgerung	202
6.	Zusammenfassung	204
7.	Abstract.....	208
8.	Quellen.....	209
	Verzeichnis akademischer Lehrer	237
	Danksagung	238

I. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Artikel:

The influence of maintaining the correct whole blood-to-anticoagulant ratio during donation on the quality of leukoreduced whole blood. Ralf Karger, Christian Lukow, Volker Kretschmer, **Transfusion**, 2011; Vol. 51, Issue 7: pp. 1486-92

Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. Ralf Karger, Christian Lukow, Volker Kretschmer, **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 2012; Vol. 39, Issue 4: pp. 277-282

Abstract:

Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood [abstract]. Ralf Karger, Christian Lukow, Volker Kretschmer, **VoxSang** 2010; 98 (Suppl 1): 205; p 0308.

Poster:

The quality of leukocyte-depleted whole blood using the automate for blood collection (MacoPharma ABC®) system. Ralf Karger, Christian Lukow, Volker Kretschmer; 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V., 19. – 22. September 2006, Frankfurt am Main.

The accuracy of different factor VIII assays in the quality control of blood products – results for stored leukocyte-depleted whole blood. Ralf Karger, Christian Lukow, Monika Weippert-Kretschmer, Volker Kretschmer; (F45); 51. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V., 21. – 24. Februar 2007, Dresden.

Continuous flow versus conventional anticoagulation in whole blood donation – quality of plasma in leukocyte-depleted whole blood. Ralf Karger, Christian Lukow, Volker Kretschmer; (P158); 51. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V., 21. – 24. Februar 2007, Dresden.

Preserving the correct whole blood to anticoagulant (WB:AC) ratio during donation results in a reduced aggregability of red blood cells (RBCs) during storage. Ralf Karger, Christian Lukow, Max Hardeman, Volker Kretschmer; Marburg/Amsterdam. 40. Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTT), 18. – 21. September 2007, Friedrichshafen am Bodensee.

II. Abkürzungen

AABB:	American Association of Blood Banks
Abb.:	Abbildung
ABC:	A utomated B lood C ollection
ACD:	Antikoagulanz- und Konservierungslösung aus Acid, Citrat und Dextrose u. a.
ADP:	Adenosindiphosphat
AI:	Aggregations-Index
AMP:	Adenosinmonophosphat
aPTT:	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS:	additive solution (Konservierungslösung) aus Adenin, Glukose und Citrat u. a.
AT:	Antithrombin
ATP:	Adenosintriphosphat
AUC:	area under the curve
BPGM:	Bisphosphoglycerat-Mutase
BSG:	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzw.:	beziehungsweise
C3-C9:	Komplementfaktoren
ca.:	circa
Ca ²⁺ :	Calcium-Ion
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD47:	cluster of differentiation 47
CFA:	cell flow properties analyzer
CFTR:	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP:	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cl:	Chlorid
CMV:	Zytomegalievirus
CO:	Kohlenmonoxid
CO ₂ :	Kohlendioxid
CPD:	Antikoagulanz- und Konservierungslösung aus Citrat, Phosphat und Dextrose u. a.
CPDA-1:	Antikoagulanz- und Konservierungslösung aus Citrat, Phosphat, Dextrose und Adenin u. a.
CR1:	Complement Rezeptor 1
CRP:	C-reaktives Protein

Da:	Dalton
Desoxy-Hb:	desoxygeniertes Hämoglobin
DEHP:	Di-2-Ethylhexylphthalat
d. h.:	das heißt
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
1,3-DPG:	1,3-Diphosphoglycerat
2,3-DPG:	2,3-Diphosphoglycerat
EAS:	experimental additive solution (experimentelle Konservierungslösung)
EDHF:	endothelium derived hyperpolarizing factor
EI:	Elongations-Index
eNOS:	endotheliale NO-Synthase
ESL:	endothelial surface layer (die das Endothel bedeckende Lage aus Makromolekülen)
et al.:	et altere
Ext.koeffizient:	Extinktionskoeffizient
FACS:	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometer)
FCD:	functional capillary density (funktionelle kapilläre Dichte)
FDA:	Food and Drug Administration
Fe ²⁺ /Fe ³⁺ :	zweiwertiges/dreiwertiges Eisen
FFP:	fresh frozen plasma (therapeutisches Plasma)
fHb:	freies Hämoglobin
fl:	Femtoliter
fMLP:	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
G:	Gauge
g:	Gramm
g/dl:	Gramm pro Deziliter
g/l:	Gramm pro Liter
GAP-DH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDH:	Glycerin-3-phosphat- Dehydrogenase
ggf.:	gegebenenfalls
GLUT-1:	Glukose Transporter 1
G-Proteine:	Guaninnucleotid-bindende Proteine
G6P-DH:	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GSH:	Glutathion
GSSG:	oxidiertes Glutathion
H ⁺ :	Wasserstoff-Ion oder Proton

Hb:	Hämoglobin
HCO_3^- :	Hydrogencarbonat
HbOC:	hemoglobin-based oxygen carriers
Hkt:	Hämatokrit
HLA:	humanes Leukozytenantigen
H_2O :	Wasser
H_2O_2 :	Wasserstoffperoxid
HZV:	Herzzeitvolumen
IgG:	Immunglobulin G
IgM:	Immunglobulin M
IL:	Interleukin
IP_3 :	Inositoltrisphosphat
IU:	international unit, internationale Einheit
K^+ :	Kalium-Ion
kDa:	Kilodalton
95 %-KI:	95 %-Konfidenzintervall
LORCA [™] :	Laser assisted Optical Rotational Cell Analyzer
M:	Mol
MCHC:	mean cellular hemoglobin concentration (mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration)
MCV:	mean corpuscular volume (mittleres Zellvolumen)
Mg^{2+} :	Magnesium-Ion
MgATP:	Magnesium-ATP
mg/dl:	Milligramm pro Deziliter
μm^2 :	Mikrometer
μM :	Mikromol
$\mu\text{mol/g}$:	Mikromol pro Gramm
$\mu\text{mol/g Hb}$:	Mikromol pro Gramm Hämoglobin
$\mu\text{mol/ml}$:	Mikromol pro Milliliter
ml:	Milliliter
mmol/l:	Millimol pro Liter
mPa.s.:	Millipascalsekunde
ms:	Millisekunde
mV:	Millivolt
MW:	Mittelwert
n:	Anzahl

Na ⁺ :	Natrium-Ion
NAD ⁺ :	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH:	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP ⁺ :	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH:	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
n. b.:	nicht bestimmt
nm:	Nanometer
NO:	Stickstoffmonoxid
NOS:	NO-Synthase
O ₂ :	Sauerstoff
OPS:	orthogonal polarization spectral
OR:	Odds ratio
Oxy-Hb:	oxygeniertes Hämoglobin
P:	purinerge Rezeptoren
p50:	Halbsättigungsdruck
Pa:	Pascal
PAF:	platelet activating factor
PAGGS:	Konservierungslösung aus Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, NaCl und Mannitol u. a.
PAT:	lipophospholipid platelet activating factor
pCO ₂ :	Kohlendioxid-Partialdruck
PE:	Phosphatidylethanolamin
PEG:	Polyethylenglykol
2-PG:	2-Phosphoglycerat
3-PG:	3-Phosphoglycerat
PGM:	Phosphoglycerat-Mutase
PI:	Propidiumjodid
PKA:	Proteinkinase A
PMN:	polymorphkernige Leukozyten
pNa:	p-Nitroanilin
pO ₂ :	Sauerstoff-Partialdruck
PS:	Phosphatidylserin
PT:	Thromboplastinzeit
PVC:	Polyvinylchlorid
QPI:	quantitative phase imaging
Rh:	Rhesus

Rh-AG:	Rhesus-associated glycoprotein
RNA:	Ribonukleinsäure
SAG:	Konservierungslösung aus NaCl, Adenin und Glukose u. a.
SAG-M:	Konservierungslösung aus NaCl, Adenin, Glukose und Mannitol u. a.
Sek:	Sekunden
SD:	standard deviation (Standardabweichung)
SIRS:	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SLIM:	spatial light interference microscopy
SNO:	S-Nitrosothiol
Tab.:	Tabelle
TAT-Komplexe:	Thrombin-Antithrombin-Komplexe
TIM:	Triosephosphat-Isomerase
TNF α :	Tumornekrosefaktor α
TRALI:	transfusion-related acute lung injury (transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz)
TRIM:	transfusion related immunomodulation
TRIS-Puffer:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer
TT:	Thrombinzeit
U:	units
u. a.:	unter anderem
U/min:	Umdrehungen pro Minute
v. a.:	vor allem
vs.:	versus
z. B.:	zum Beispiel
z. T.:	zum Teil

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Lipiddoppelschicht und des Membranskelettes mit Darstellung der Verbindungskomplexe aus Protein Bande 3 und Protein 4.1. © (2008) National Academy of Sciences, U.S.A. (312).	28
Abbildung 2: Reaktionsschritte der Glykolyse (Embden-Meyerhof-Weg), nach Löffler 2001 (225).	30
Abbildung 3: Reaktionsschritte des Rapoport-Luebering-Shunt, nach Löffler 2001 (225).	32
Abbildung 4: Reaktionsschritte des Pentose-Phosphat-Weges, nach Löffler 2001 (225).	33
Abbildung 5: O ₂ -Bindungskurve mit Darstellung der Faktoren, welche zu einer Rechtsverschiebung der O ₂ -Bindungskurve führen. Aus Speckmann, Hescheler und Köhling, Physiologie, 6. Auflage © 2013 Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München (107).	35
Abbildung 6: ABC [®] -MacoPharma-Waage mit eingelegtem Blutbeutelssystem, © MacoPharma.	51
Abbildung 7: Das integrierte Roller-Pumpsystem der ABC [®] -MacoPharma-Waage mit zwei optischen Sensoren zur Überwachung des Blutflusses. © MacoPharma.	52
Abbildung 8: MacoPharma DDG-System mit CPDA-1 Satellitenbeutel. © MacoPharma.	54
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des LORCA [™] (Laser assisted optical rotational cell analyser, R & R, Mechatronics, Zwaag, Niederlande). © 2003/2004 by Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands (108).	80
Abbildung 10: Verformbarkeitskurve. © 2003/2004 by Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands (108).	82
Abbildung 11: Syllektogramm mit den vier Stadien des Messablaufes. © 2003/2004 by Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands (108).	83
Abbildung 12: Kurvenverlauf des pH-Wertes über 49 Lagerungstage.	88
Abbildung 13: Kurvenverlauf der Glukose-Konzentration in mg/dl über 49 Lagerungstage.	89
Abbildung 14: Kurvenverlauf der Laktat-Konzentration in mmol/l über 49 Lagerungstage.	91
Abbildung 15: Kurvenverlauf der ATP-Konzentration in µmol/g Hb über 49 Lagerungstage.	92
Abbildung 16: Kurvenverlauf der 2,3-DPG-Konzentration in µmol/Hb über 42 Lagerungstage.	94
Abbildung 17: Kurvenverlauf des freien Hämoglobins in g pro Vollblutkonserve über 49 Lagerungstage.	95

Abbildung 18: Kurvenverlauf der Hämolyserate in % über 49 Lagerungstage.	97
Abbildung 19: Kurvenverlauf der Kalium-Konzentration in mmol pro Konserve über 49 Lagerungstage.	98
Abbildung 20: Kurvenverlauf der Thrombinzeit in Sekunden über 49 Lagerungstage.....	99
Abbildung 21: aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Sekunden über 49 Lagerungstage.	101
Abbildung 22: Kurvenverlauf der Thromboplastinzeit nach Quick (PT) in % über 49 Lagerungstage.	102
Abbildung 23: Kurvenverlauf der Faktor-V-Aktivität in % über 49 Lagerungstage.	103
Abbildung 24: Kurvenverlauf der Faktor-VIII-Aktivität in % über 49 Lagerungstage.....	105
Abbildung 25: Kurvenverlauf der Fibrinogen-Konzentration in g/l über 49 Lagerungstage.	106
Abbildung 26: Kurvenverlauf der Antithrombin-Konzentration in % über 49 Lagerungstage.	107
Abbildung 27: Kurvenverlauf der D-Dimere in µg/l über 49 Lagerungstage.	108
Abbildung 28: Kurvenverlauf der TAT-Komplexe in µg/l über 49 Lagerungstage, Darstellung von Median und größtem Wert.	110
Abbildung 29: Kurvenverlauf des EI (AUC) über 49 Lagerungstage.	111
Abbildung 30: Kurvenverlauf des AI über 49 Lagerungstage.	113
Abbildung 31: Kurvenverlauf von $t_{1/2}$ in Sekunden über 49 Lagerungstage.....	114

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Zusammensetzung der CPDA-1 Lösung (255).	55
Tabelle 2: Reagenzien-Inhalte des BD Leucocount™-Kit (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) (44).	57
Tabelle 3: Beschreibung des BD Trucount™-Röhrchens (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) (44).	57
Tabelle 4: Reagenzien des Testkits ATP Hexokinase (Rolf Greiner BioChemica, Flacht, Deutschland) (303).	63
Tabelle 5: Inhalte der einzelnen Flaschen des 2,3-DPG Testkits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) (302).	65
Tabelle 6: Reagenzien-Lösungen des 2,3-DPG Testkits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) (302).	66
Tabelle 7: Zusammensetzung der Gerinnungs-Testkits 1.	78
Tabelle 8: Zusammensetzung der Gerinnungs-Testkits 2.	79
Tabelle 9: Berechnung der Scherspannung (108).	81
Tabelle 10: gruppenspezifische Aufteilung nach Geschlecht und Blutgruppe sowie Parameter vor der Spende.	86
Tabelle 11: gruppenspezifische Spendeparameter und Restleukozytengehalt.	87
Tabelle 12: pH-Wert bei 22° C, ABC-Gruppe.	88
Tabelle 13: pH-Wert bei 22° C, konventionelle Gruppe.	88
Tabelle 14: Glukose in mg/dl, ABC-Gruppe.	90
Tabelle 15: Glukose in mg/dl, konventionelle Gruppe.	90
Tabelle 16: Laktat in mmol/l, ABC-Gruppe.	91
Tabelle 17: Laktat in mmol/l, konventionelle Gruppe.	91
Tabelle 18: ATP in µmol/g Hb, ABC-Gruppe.	93
Tabelle 19: ATP in µmol/g Hb, konventionelle Gruppe.	93
Tabelle 20: 2,3-DPG in µmol/g Hb, ABC-Gruppe.	94
Tabelle 21: 2,3-DPG in µmol/g Hb, konventionelle Gruppe.	94
Tabelle 22: fHb in g/Konserve, ABC-Gruppe.	96
Tabelle 23: fHb in g/Konserve, konventionelle Gruppe.	96

Tabelle 24: Hämolyserate in %, ABC-Gruppe	97
Tabelle 25: Hämolyserate in %, konventionelle Gruppe	97
Tabelle 26: Kalium in mmol, ABC-Gruppe.....	98
Tabelle 27: Kalium in mmol, konventionelle Gruppe.....	98
Tabelle 28: Thrombinzeit in Sekunden, ABC-Gruppe.....	100
Tabelle 29: Thrombinzeit in Sekunden, konventionelle Gruppe.....	100
Tabelle 30: aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Sekunden, ABC-Gruppe...	101
Tabelle 31: aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Sekunden, konventionelle Gruppe.....	101
Tabelle 32: Thromboplastinzeit nach Quick (PT) in %, ABC-Gruppe	102
Tabelle 33: Thromboplastinzeit nach Quick (PT) in %, konventionelle Gruppe.	102
Tabelle 34: Faktor-V-Aktivität in %, ABC-Gruppe.....	104
Tabelle 35: Faktor-V-Aktivität in %, konventionelle Gruppe.....	104
Tabelle 36: Faktor-VIII-Aktivität in %, ABC-Gruppe.....	105
Tabelle 37: Faktor-VIII-Aktivität in %, konventionelle Gruppe.....	105
Tabelle 38: Fibrinogen in g/l, ABC-Gruppe.	106
Tabelle 39: Fibrinogen in g/l, konventionelle Gruppe.....	106
Tabelle 40: Antithrombin-Aktivität in %, ABC-Gruppe.	107
Tabelle 41: Antithrombin-Aktivität in %, konventionelle Gruppe.	107
Tabelle 42: D-Dimere in µg/l, ABC-Gruppe.	109
Tabelle 43: D-Dimere in µg/l, konventionelle Gruppe.	109
Tabelle 44: TAT-Komplexe in µg/l, ABC-Gruppe.....	110
Tabelle 45: TAT-Komplexe in µg/l, konventionelle Gruppe.	110
Tabelle 46: Elongations-Index (AUC), ABC-Gruppe	112
Tabelle 47: Elongations-Index (AUC), konventionelle Gruppe.	112
Tabelle 48: Aggregations-Index in %, ABC-Gruppe.....	113
Tabelle 49: Aggregations-Index in %, konventionelle Gruppe.....	113
Tabelle 50: $t_{1/2}$ in Sekunden, ABC-Gruppe.....	114

Tabelle 51: $t_{1/2}$ in Sekunden, konventionelle Gruppe.....	114
Tabelle 52: Übersicht Lagerungsparameter. Daten sind als AUC-Werte (Standard- abweichung) angegeben.	115

1. Einleitung

1.1. Transfusionsmedizin

Die Anfänge der Transfusionsmedizin mögen am Beginn der zweiten Hälfte des 17. Jahrhunderts liegen, als zunächst experimentell Blut von Tier zu Tier, 1667 in Paris erstmals Blut von einem Lamm auf einen Menschen übertragen wurde. Anfangs bestand die Indikation einer Blutübertragung in der Therapie von Krankheiten wie z. B. der „geistigen Verwirrtheit“ oder Lepra. Das Blut des als „rein“ geltenden Lammes sollte den Empfängern „günstige Lebensgeister“ einflößen. Aber auch Widder- und Kalbsblut u. a. fanden Verwendung (45). Aufgrund der nicht selten letalen Ausgänge wurde zunächst gegen Ende des 17. Jahrhunderts gänzlich von Blutübertragungen Abstand genommen. Erst gegen Ende des 18. Jahrhunderts erlebte die Blutübertragung eine Renaissance und 1825 erfolgte durch den Engländer Blundell die erste erfolgreiche Blutübertragung von Mensch zu Mensch bei einer post partum ausgebluteten Patientin (45, 46). Bis zu der bahnbrechenden Beschreibung der Blutgruppen durch Landsteiner 1901 war die Blutübertragung im Verlauf des 19. Jahrhunderts weiterhin häufig von letalen Ausgängen begleitet. 1928 wurde vom Völkerbund die AB0-Klassifikation eingeführt (380). 1940 beschrieben Landsteiner und Wiener das Rhesus-Antigen (45, 212).

Die Transfusion erfolgte anfangs direkt mit Frischblut vom Spender auf den Empfänger, meist über eine chirurgisch angefertigte Anastomose zwischen der Arteria radialis des Spenders und der Vena cubitalis des Empfängers. Zudem gab es verschiedene Trichter- bzw. Spritzensysteme, die erst Darmrohre, später mechanische Apparaturen wie z. B. die „Becksche Mühle“ (Pumpe) oder die „Troicardkanüle“ umfassten (380). Während des ersten Weltkrieges wurde bei gesteigertem Blutbedarf zunächst in Großbritannien, dann auch in den Vereinigten Staaten von Amerika dazu übergegangen, Blut in sterile Glasbehältnisse zu sammeln und indirekt zu übertragen. 1915 wurde von Lewisohn Natriumcitrat als Antikoagulanzen eingeführt (4). 1919 erfolgte am Rockefeller-Institut die Einrichtung eines Blutdepots (45). Die erste sogenannte Blutbank entstand 1937 am Cook County Hospital in Chicago (380). In Deutschland erfolgten im Gegensatz zu anderen europäischen Ländern, den Vereinigten Staaten und der Sowjetunion bis weit nach dem zweiten Weltkrieg und bis auf sehr wenige Ausnahmen während des zweiten Weltkrieges fast sämtliche Transfusionen als direkte Frischbluttransfusionen. Die „Becksche Mühle“ war bis in die 1960er Jahre im Einsatz (380).

Zunächst wurden Blutkonserven lediglich mit Natriumcitrat zur Antikoagulation versetzt. Die Lagerungsfähigkeit belief sich nur auf ein paar Tage. 1916 beschrieben Rous und Turner, dass sich die Überlebenszeit gesammelter Erythrozyten durch den Zusatz von Dextrose auf bis zu fünf Tagen verlängern lässt (200, 360, 380). Robertson verwendete als erster Lösungen aus Natriumcitrat und Glukose und konnte dadurch die Lagerungszeit auf 21 Tage ausweiten (83). Jedoch konnten glukoseenthaltende Lösungen nicht durch Autoklavierung sterilisiert werden, da dieses bei relativ hohen pH-Werten zu einer Karamellisierung der Glukose führte. Durch Loutit et al. wurde 1943 zunächst in Großbritannien eine acide Citrat-Lösung (ACD = Acid, Citrat, Dextrose) eingeführt. Aufgrund des niedrigeren pH-Wertes konnte diese Lösung problemlos autoklaviert werden, ohne dass Glukose karamellisierte. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes ließ sich zudem die Hämolyse und der K^+ -Austritt aus den Erythrozyten vermindern, die Lagerungszeit und das Posttransfusionsüberleben der Erythrozyten im Empfängerorganismus verlängern. Durch Zusatz von Adenin und Inosin erzielte man eine weitere Qualitätssteigerung (116, 200, 228, 339). Die stark saure Antikoagulanzlösung ACD führte aber auch dazu, dass Blutbestandteile bei der Sammlung und Lagerung geschädigt wurden. Insbesondere Erythrozyten in den ersten Millilitern der Blutspende waren der stark sauren Umgebung ausgesetzt. Gibson et al. konnten mit dem Zusatz von organischem Phosphat in CPD-Suspensionen (Citrat, Phosphat, Dextrose, eingeführt 1957) den pH-Wert des Konservierungsmediums erhöhen. In CPD-Suspensionen zeigte sich gegenüber den ACD-Suspensionen eine bessere Bewahrung bestimmter Lagerungsqualitätsparameter wie 2,3-DPG und ATP (116, 143) und die Lagerungszeit ließ sich bis auf 42 Tage erhöhen (83). Mit dem Zusatz von Adenin zu CPD-Lösungen, d. h. mit CPDA-1 konnte das *in vivo* Überleben auf 81 % nach einer fünfwöchigen Lagerung von Vollblut gesteigert werden (400).

Die weiteren Entwicklungen auf dem Gebiet der Blutkonservierung und Transfusionsmedizin sind seitdem von Bemühungen gekennzeichnet, sowohl die Qualität des gelagerten Blutes möglichst optimal zu konservieren als auch die Lagerungszeit auszudehnen. Eine sechswöchige Lagerungszeit lässt sich mit kommerziellen Konservierungsmedien wie CPDA-1, SAG-M (NaCl, Adenin, Glukose und Mannitol), AS-1 (u. a. mit Adenin, NaCl, Glukose und Citrat), AS-2, AS-3 und AS-5 u. a. erreichen. Mit PAGGS (Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, NaCl, Mannitol) wurde eine Lagerung von Erythrozytenkonzentraten bis zu sieben Wochen bei Einhaltung der Qualitätsrichtlinien erzielt (167). Wurde Blut anfänglich nur als Vollblut gewonnen und gelagert, überwiegt heute die Blutkomponenten-

spende mit Separation in einzelne Blutbestandteile wie Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, Plasma und Gerinnungsfaktoren (Blutkomponentenspende ab den 1970er Jahren). Weit verbreitet ist die Leukozytendepletion vor Lagerung von Erythrozytenkonzentraten oder Vollblut.

1.2. Lagerungsschaden

Einfluss auf die Lagerungsdauer von Blut nehmen die zahlreichen biochemischen und biomechanischen Veränderungen, die sich während der Lagerung ereignen. Schon während der Blutsammlung wird die Qualität des Blutes durch den Sammlungsschaden („lesion of collection“) beeinträchtigt. Während der Lagerung von Erythrozyten bei Lagerungstemperaturen um 4° C kommt es bekanntermaßen zu einem Verlust von Energieträgern und zu einer Akkumulation bioreaktiver Substanzen und Zellabbauprodukten. Diese Veränderungen werden als sogenannter Lagerungsschaden („lesion of storage“) zusammengefasst (4, 360, 391). Die Lagerung von Blutprodukten erfolgt in einem abgeschlossenen System. Weder können während der Lagerungszeit lebenswichtige Nährstoffe hinzugefügt noch Zellabbauprodukte entfernt werden, wie dieses unter *in vivo* Bedingungen kontinuierlich erfolgt. Zu den metabolischen Veränderungen zählen die progredient voranschreitende Verminderung der Glukosekonzentration, der Anstieg von Laktat und Kalium sowie die Abnahme der Konzentration von ATP und 2,3-DPG. Es kommt zur Anreicherung von radikalen O₂-Spezies, welche oxidativen Schaden an Proteinen und Lipiden der Erythrozyten verursachen können. Durch Absonderung von Vesikeln und Untergang einiger der gelagerten Erythrozyten kommt es zur Ansammlung von fHb (freiem Hämoglobin). Daneben ereignen sich Formveränderungen der Erythrozyten von Diskozyten zu Echinozyten oder Sphäroechinozyten. Rheologische Eigenschaften der roten Blutzellen wie ihre Verformbarkeit und ihre Aggregationsfähigkeit verändern sich. Zahlreiche immunologisch wirksame Prozesse werden initiiert (83). Eine längere Lagerungszeit begünstigt zudem die Interaktion von Erythrozyten mit dem Endothel des Empfängers, d. h. eine Adhäsion der gelagerten Erythrozyten an die Endothelzellen mit proinflammatorischen und prokoagulatorischen Auswirkungen (74, 167, 349).

In jüngerer Zeit ergeben sich aus verschiedenen Studien Hinweise, dass insbesondere länger gelagertes Blut mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität der Empfänger

assoziiert ist (202, 360, 372). Dabei scheinen möglicherweise Veränderungen der rheologischen Eigenschaften, aber auch immunologische Prozesse eine entscheidende Rolle zu spielen. Die bisher etablierten Qualitätsparameter für gelagerte Blutprodukte umfassen die Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Laktat, ATP, 2,3-DPG, Kalium, fHb, der Hämolyserate und des pH-Wertes.

Im Folgenden soll zunächst ein Einblick in den Aufbau und die Funktionsweise des Erythrozyten gegeben werde.

1.3. Erythrozyt

Die Hauptaufgabe der Erythrozyten besteht in der Gewährleistung des Gastransportes im Organismus. Sie versorgen die Gewebe und Organe mit O_2 aus der Lunge und transportieren CO_2 aus der Peripherie in die Lunge. Der Austausch von O_2 und CO_2 zwischen Erythrozyten und Geweben erfolgt durch Diffusion. Erythrozyten sind ein wichtiger Puffer des Blutes. Mit ihren morphologischen Eigenschaften nehmen sie Einfluss auf die Blutströmung und sie sind *endokrinologisch* aktiv in die Funktionen der mikrozirkulatorischen Autoregulation miteingebunden (117).

Erythrozyten haben eine bikonkave diskoidale (Scheibchen-) Form mit einer zentralen Eindellung. Ihr Durchmesser liegt zwischen 7,5 und 8,5 μm und ihre Höhe beträgt durchschnittlich 1,7 bis 2,4 μm (253, 277, 292). Mit dieser Form sind mehrere Vorteile assoziiert. Sie scheint optimal für eine maximal mögliche Verformbarkeit zu sein (74). Durch die Formgebung erhöht sich die Oberfläche der Zellen bis auf 140 μm^2 und bietet dadurch eine größere Fläche für den Gasaustausch (277). Die Diffusionsdistanz der Gase minimiert sich von innerhalb nach außerhalb der Zelle (277, 343). Zudem scheint die bikonkave Form einen stabilisierenden Effekt auf die laminare Strömungsbalance zu haben (359).

Der Aufbau der Erythrozyten besteht aus einer Zellmembran, die eine hochkonzentrierte visköse Hämoglobinsuspension umschließt. Die Zellmembran setzt sich aus einer Lipiddoppelschicht und einem zweidimensionalen Membranskelett zusammen. Während ihrer Lebenszeit von durchschnittlich 120 Tagen müssen die Erythrozyten bis zu 1000-mal am Tag die Zirkulation passieren. Sie verfügen über eine außergewöhnliche Verformbarkeit, dank derer sie Gefäße der Mikrozirkulation passieren können, welche einen weitaus geringeren Durchmesser als die Erythrozyten selbst aufweisen. Zudem besitzen die Erythrozyten die Eigenschaft, sich bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten und bei Stase der Blutströmung zu Aggregaten zusammenzulagern und sich unter Scherkräften außerordentlich zu verformen. Verformbarkeit und Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten tragen wesentlich zu den rheologischen Strömungseigenschaften des Blutes bei.

Nach ihrer Bildung aus der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark, der Erythropoese, betreten sie als kernhaltige Retikulozyten die Zirkulation. Während des ersten Lebensstages in der Zirkulation erfolgt die Umwandlung in den reifen Erythrozyten. Dabei verlieren sie ihren Zellkern und das endoplasmatische Retikulum degradiert. Auch verfügen sie über keine weiteren festen Zellbestandteile wie z. B. Mitochondrien. Dieses kommt zum einen ihrer Verformbarkeit zugute, da die Zellmembran lediglich die visköse

Hämoglobininlösung umschließt (277). Auf der anderen Seite können zu Schaden gekommene Zellbestandteile nicht ohne weiteres ersetzt bzw. repariert werden. Geschädigte Zellbestandteile werden stattdessen gezielt über die Vesikulation aus den Erythrozyten eliminiert. Das intrazelluläre Hämoglobin ist für den O_2 - und CO_2 -Transport verantwortlich. Über oxidative Reaktionen mit dem Fe^{2+} im Hämoglobin können jedoch freie O_2 -Radikale gebildet werden, welche schädigend auf Zellbestandteile wirken. Zur Vorbeugung solcher oxidativen Schäden sind die Erythrozyten mit speziellen antioxidativen Schutzmechanismen ausgerüstet. Die Aufrechterhaltung des metabolischen Status der Erythrozyten erfolgt über drei Stoffwechselwege. Über die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Weg) wird anaerob Glukose zu ATP metabolisiert. Über einen Nebenweg des Embden-Meyerhof-Weges, den Rapoport-Lübering-Zyklus, erfolgt die Synthese von 2,3-DPG, welches zur Stabilisierung des Hbs benötigt wird. Als dritter Weg erfolgt über den Pentose-Phosphat-Weg, ebenfalls durch die Verstoffwechselung von Glukose, die Generierung des antioxidativen Co-Faktors NADPH.

1.3.1. Erythrozytenaufbau

Die Erythrozytenmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, welche mit einem unter ihr liegenden Membranskelett aus einem zweidimensional angeordneten Netzwerk aus Spektrin- und Aktin-Filamenten verbunden ist. Die Membran besteht zu 52 % aus Proteinen, zu 40 % aus Lipiden und zu 8 % aus Kohlenhydraten (252).

1.3.1.1. Lipiddoppelschicht

Wie sämtliche Zellen von Säugetieren sind die Erythrozyten von einer Doppelschicht aus Lipiden umgeben. Die Lipiddoppelschicht besteht aus zwei Lagen, eine dem Zytoplasma zugewandte und eine dem Extrazellulärraum zugewandte Lage. Bei den Lipiden handelt es sich zu gleichen Gewichtsanteilen um amphiphile Phospholipide und Cholesterol. Cholesterol ist gleichmäßig sowohl in der inneren, dem Zytoplasma zugewandten Lage als auch in der äußeren Lage der Lipiddoppelschicht vertreten. Die Phospholipide sind in der Doppelschicht hingegen asymmetrisch verteilt. In der äußeren Lage befinden sich überwiegend Phosphatidylcholin (30 %) und Sphingomyelin (25 %) (beide ungeladen). In der inneren, dem Zytoplasma zugewandten Lage, dominieren anionische Amino-phospholipide wie Phosphatidylserin (PS, 14 %) und Phosphatidylethanolamin (PE, 28 %),

zu einem geringen Anteil auch Phosphoinositid (252, 253). Die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung unterliegt einer enzymatischen Kontrolle mittels Translokasen (Flippase und Floppase) sowie der Scramblase. Die Flippase transportiert energieverbrauchend, d. h. ATP-abhängig, Phospholipide von der äußeren Lage der Doppelschicht in die innere Lage, d. h. vornehmlich PS und PE. Die Floppase bewegt ebenfalls ATP-abhängig, jedoch langsamer als die Flippase, umgekehrt Phospholipide aus der inneren in die äußere Lage (234). Die Ca^{2+} -abhängige Scramblase hingegen transportiert die Phospholipide entlang deren Konzentrationsgradienten energieunabhängig in beide Richtungen (101, 253, 325). Die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide erfolgt über die Aktivierung der Translokasen und Hemmung der Scramblase und ist äußerst wichtig für die Gewährleistung der Zellintegrität. So steht z. B. eine Externalisierung von PS in die äußere Lage der Lipiddoppelschicht v. a. mit der Erkennung und Opsonierung der entsprechenden Erythrozyten durch Makrophagen in Verbindung (88, 253). Zudem bestehen wahrscheinlich die Membran stabilisierende Interaktionen zwischen PS mit Spektrin, Protein Kinase C und Annexin. Diese Interaktionen können jedoch nur bestehen, sofern sich PS in der inneren Lage der Doppelschicht befindet (234).

In die Lipiddoppelschicht sind weiterhin zahlreiche Proteine eingebunden, welche verschiedenste Aufgaben und Funktionen einnehmen. Einige dieser Proteine sind als periphere Proteine an der zytoplasmatischen Oberfläche lokalisiert, andere durchdringen als integrale Proteine die gesamte Zellmembran. Zu den integralen Membranproteinen zählen z. B. Protein Bande 3 und die Glykophorine A bis D. Glykophorine sind mit N-Acetylneuraminsäure-Resten bestückt und verleihen der Membranoberfläche eine negative Ladung. Die negative Oberflächenladung wirkt einer Adhäsion der Erythrozyten an andere im Blut zirkulierende Zellen und an das Gefäßendothel entgegen. Protein Bande 3 dient neben seiner Funktion als Verbindungsprotein zwischen Membranskelett und Lipiddoppelschicht u. a. als Transporter für CO_2 über den Austausch von Cl^- und HCO_3^- und ist als Bindungsstelle für glykolytische Enzyme in die metabolischen Funktionen der Erythrozyten mit eingebunden. Mit Protein Bande 3 sind Blutgruppenantigene wie das Rhesus-Protein assoziiert, sowie CD47, ein Schutzprotein, welches dem Immunsystem die körpereigene Zugehörigkeit signalisiert (130). Protein Bande 4.1 steht in Verbindung mit den Blutgruppenantigenen Duffy und Kell (siehe Abb. 1). Aquaporin 1 ist ein Wassertransporter, Kidd-Antigen-Protein dient als Harnstofftransporter und RhAG zum Transport von Blutgasen. Zudem gibt es verschiedene aktive und passive Elektrolyt-

transportproteine wie die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, die $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl-Co-Transporter}$, $\text{Na}^+\text{-Cl-Co-Transporter}$, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Co-Transporter}$, $\text{K}^+\text{-Cl-Co-Transporter}$ und den Gardos-Kanal, welche für die Aufrechterhaltung des Kationen- und Volumenhaushaltes verantwortlich sind (253).

Des Weiteren sind in die Membran lipid-rafts (Lipid-Flöße) integriert. Lipid-rafts sind Mikrodomänen in der Zellmembran, die mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind. Sie umfassen v. a. Membranproteine wie Flottilin-1, Flottilin-2, Stomatin und auch Glykosylphosphatidylinositol-Anker. Diese Strukturen sind Bestandteile der erythrozytären Signalgebung (314).

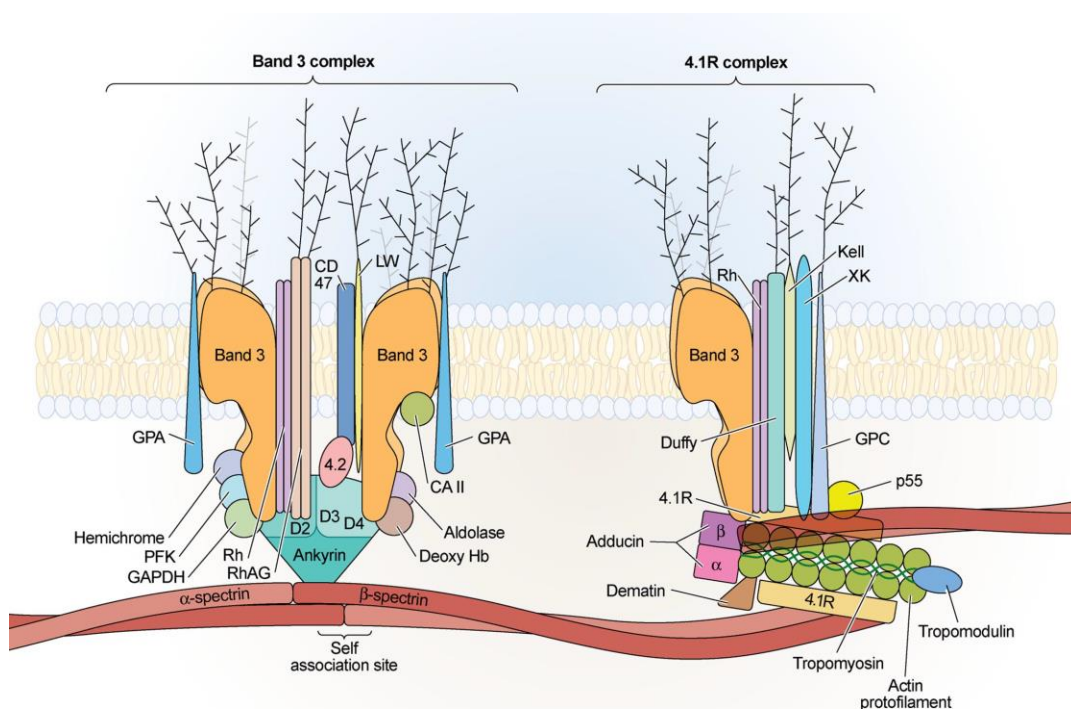


Abbildung 1: Aufbau der Lipiddoppelschicht und des Membranskeletts mit Darstellung der Verbindungskomplexe aus Protein Bande 3 und Protein 4.1. © (2008) National Academy of Sciences, U.S.A. (312).

1.3.1.2. Membranskelett

Grundlage des Membranskeletts ist ein zweidimensional und hexagonal angeordnetes, auf Spektrin basierendes Proteinnetzwerk. Spektrin-Filamente bestehen aus einer α - und einer β -Kette und sind aus 36 dreifach-helikale angeordneten Wiederholungen (Repeats) von 106 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut. Dabei umfasst die α -Kette 20 der Aminosäuren-Wiederholungen, die β -Kette hingegen nur 16. Durch laterale selbstassoziierende Interaktionen zwischen bestimmten dreifach-helikalen Wiederholungen bilden die α - und

die β -Kette ein antiparalleles Spektrin-Heterodimer. Wiederum durch laterale Interaktionen zwischen der α -Kette eines Heterodimeres und der β -Kette eines anderen Heterodimeres wird ein Spektrin-Tetramer geformt. Die Enden der Spektrin-Tetramere sind mit Aktin und Protein Bande 4.1 zu einem sogenannten junktionalen Komplex verbunden, wobei Protein Bande 4.1 die an sich nur schwache Verbindung von Spektrin und Aktin verstärkt. An diesem junktionalen Komplex sind weiterhin u. a. Tropomodulin, Tropomyosin, Adducin und Demantin (Protein Bande 4.9) beteiligt. Überwiegend werden in so einem „Knotenpunkt“ sechs Spektrin-Tetramere miteinander gebunden (hexagonale Anordnung), gelegentlich aber auch fünf oder sieben Tetramere (146, 253).

Die Verbindung des Membranskelettes mit der Lipiddoppelschicht erfolgt über zwei verschiedene Komplexe (siehe Abb. 1). Zum einen besteht über das integrale Membranprotein Glykophorin C eine Verbindung mit dem junktionalen Komplex aus Protein Bande 4.1, Aktin und Spektrin. Zum anderen verankert ein Komplex aus Protein Bande 3, Ankyrin und Spektrin das Membranskelett mit der Doppelschicht (253, 312).

In dem Komplex aus Protein Bande 3, Ankyrin und Spektrin liegt Protein Bande 3 als Tetramer vor. Über Ankyrin erfolgt die Bindung an ein Spektrin-Filament an einer beliebigen Stelle in der Nähe des Zentrums eines Spektrin-Filamentes (146, 312). An diesem Komplex sind zudem RhAG, Protein Bande 4.2, Glykophorin A, Rhesus-Komplex-Proteine und CD47 beteiligt (253, 312).

Mit der Verbindung aus Glykophorin C mit dem junktionalen Komplex sind u. a. Protein Bande 3 in dimerer Form und die Blutgruppenantigene Duffy, Rhesus-Komplex-Proteine, Kell und XK assoziiert (253, 312). Protein Bande 3 verstärkt wahrscheinlich die Membranverbindung über die Assoziation mit Adducin, Demantin und Spektrin. Adducin erhöht zudem die Affinität von Spektrin zu Aktin (10).

Fast sämtliche Proteine der Erythrozytenmembran können ATP-abhängig phosphoryliert werden. Hierdurch kann die Stabilität bzw. der Zusammenhalt der Membrankomponenten beeinflusst werden (10, 88, 220, 236).

Zahlreiche weitere Membranproteine sind bisher bekannt (253). Die Kenntnis wird sich mit fortschreitenden Proteomanalysen (Proteom = Gesamtheit aller Proteine) ausweiten. Zudem wurden und werden zahlreiche verschiedene mathematische und physikalisch-theoretische Modelle entwickelt, um die mechanischen Eigenschaften der Erythrozyten zu beschreiben (279, 286).

1.3.2. Metabolismus der Erythrozyten

Da die Erythrozyten über keine Mitochondrien verfügen, steht ihnen zur Energiegewinnung lediglich die anaerobe Glukoseverwertung über die Glykolyse und den Pentose-Phosphat-Weg (Hexose-Monophosphat-Weg) zur Verfügung.

90 bis 95 % der von den Erythrozyten aufgenommenen Glukose wird über die Glykolyse metabolisiert. Bei der Glykolyse (Emden-Meyerhof-Weg) wird der Energieträger ATP synthetisiert. ATP ist für zahlreiche energieabhängige Prozesse der Zelle notwendig. In einem Nebenweg des Emden-Meyerhof-Wegs, dem Rapoport-Luebering-Shunt, erfolgt die Bildung von 2,3-DPG. 2,3-DPG ist ein wichtiger Regulator der O_2 -Affinität des Hb. Die Verwertung der weiteren 5 bis 10 % Glukose erfolgt über den Pentose-Phosphat-Weg, bei welchem NADPH gewonnen wird. NADPH ist als Co-Faktor wichtiger Bestandteil antioxidativer Reduktionsprozesse (24, 54).

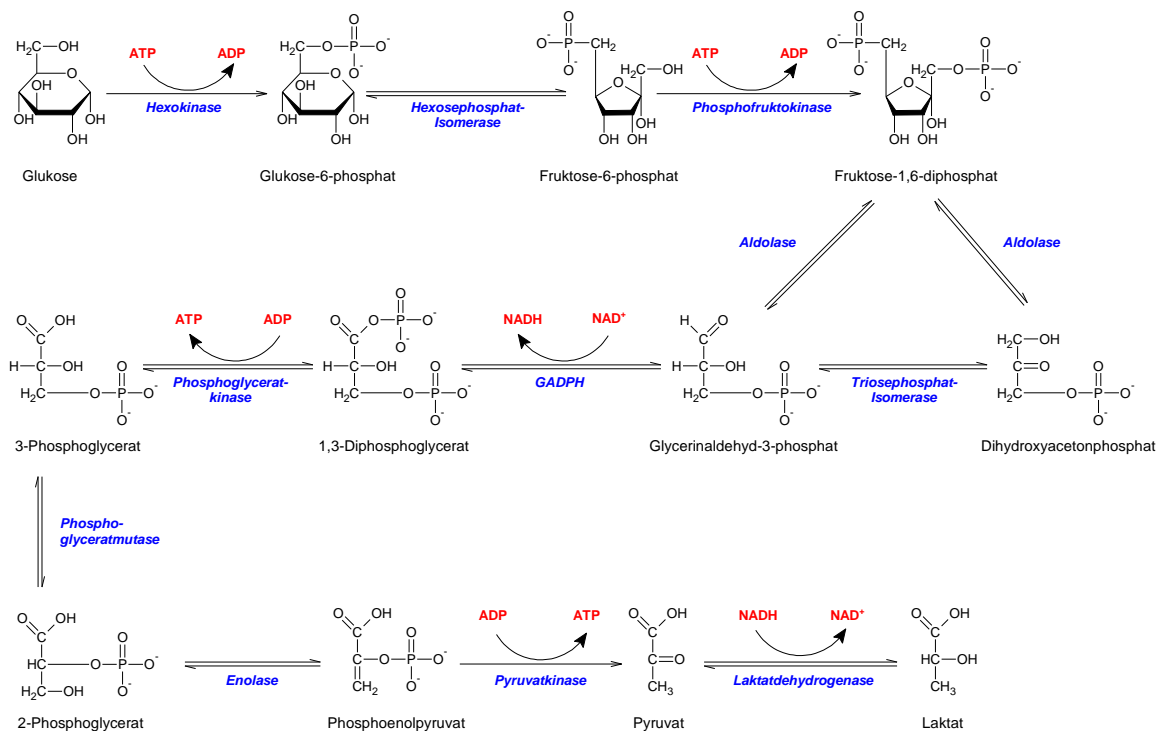


Abbildung 2: Reaktionsschritte der Glykolyse (Emden-Meyerhof-Weg). GADPH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. (Nach Löffler 2001 (225)).

Die Glykolyse beginnt mit der Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-phosphat durch die Hexokinase (siehe Abb. 2). Die Phosphatgruppe stammt von einem Molekül ATP. Anschließend katalysiert die Hexosephosphat-Isomerase die Bildung von Fruktose-6-phosphat. Unter Verbrauch von einem weiteren Molekül ATP, welches eine zweite Phosphatgruppe zur Verfügung stellt, erfolgt durch die Phosphofruktokinase die Bildung

von Fruktose-1,6-diphosphat. Dieses wird im nächsten Schritt durch das Enzym Aldolase reversibel in zwei Triosen umgewandelt, Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat werden durch die Triosephosphat-Isomerase ineinander umgewandelt, mit dem Ziel, ein Gleichgewicht zwischen den beiden Triosen herzustellen. Jedoch wird Glycerinaldehyd-3-phosphat durch die Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase = GAPDH) kontinuierlich mit Hilfe von NAD^+ zu 1,3-DPG (1,3-Diphosphoglycerat) oxidiert und mit anorganischem Phosphat phosphoryliert. Dabei wird NAD^+ zu NADH reduziert. Im nächsten Schritt wird durch die Phosphoglyceratkinase das energiereiche Phosphat von 1,3-DPG auf ADP übertragen und es entstehen ATP und 3-Phosphoglycerat. Durch die Phosphoglyceratmutase und die Enolase wird darauf Phosphoenolpyruvat katalysiert, welches unter erneutem Energiegewinn von einem Molekül ATP durch die Pyruvatkinase in Pyruvat umgewandelt wird. Pyruvat wird letztendlich bei Fehlen von Mitochondrien und des Zitratzyklus unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe von NADH durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert. Hierbei wird auch NAD^+ regeneriert, was für die Oxidierung von 3-Phosphoglycerinaldehyd benötigt wird (54, 225).

Da aus einem Mol Glukose zwei 1,3-DPG gebildet werden, kommt es bei der Glykolyse unter Verbrauch von zwei Mol ATP zur Bildung von vier Mol ATP, d. h. es liegt ein Gewinn von zwei Mol ATP vor (225).

Geschwindigkeitsbestimmend für die Glykolyse sind die Aktivitäten der Enzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase. Beide Enzyme sind insbesondere bei hohen pH-Werten aktiv und zeigen bei pH-Werten unter 7,0 nur eine geringe Aktivität. Zudem sind beide Enzyme abhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} . Anorganisches Phosphat erhöht ebenfalls die Geschwindigkeit der Glykolyse (54).

Die Aufnahme von Glukose erfolgt passiv, d. h. unabhängig von Insulin, über den membranständigen Glukosetransporter GLUT-1 in den Erythrozyt (233). Für die Zwischenprodukte der Glykolyse, die negativ geladenen phosphorylierten Zucker, ist die Erythrozytenmembran impermeabel (54). Die Glukosekonzentration im Zytoplasma ist ungefähr gleich zu der des Blutplasmas (233). Zusätzlich zu Glukose haben die Erythrozyten die Möglichkeit, einige andere Zucker und Nukleoside als Energiequelle zu nutzen. Hierzu zählen Adenosin, Inosin, Fruktose, Mannose, Galaktose und Dihydroxyaceton (54).

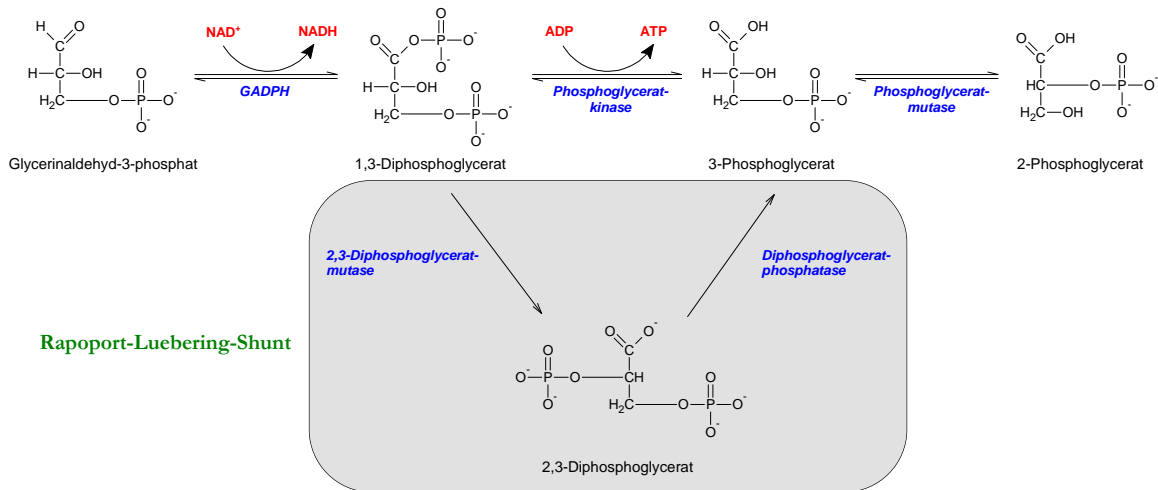


Abbildung 3: Reaktionsschritte des Rapoport-Luebering-Shunt (nach Löffler 2001 (225)).

Der Rapoport-Luebering-Shunt (siehe Abb. 3) beginnt mit einer Abzweigung beim 1,3-Diphosphoglycerat (1,3-DPG), das durch die 2,3-Diphosphoglyceratmutase (Diphosphoglyceratsynthase) zu 2,3-DPG katalysiert wird. Ungefähr 20 % des 1,3-DPG werden unter physiologischen Bedingungen im Rapoport-Luebering-Shunt zu 2,3-DPG ohne Gewinn von ATP katalysiert. Die 2,3-Diphosphoglyceratmutase kann jedoch auch als Phosphatase fungieren. Als Diphosphoglyceratphosphatase kann sie 2,3-DPG in 3-Phosphoglycerat umwandeln. 3-Phosphoglycerat mündet wieder in den Emden-Meyerhof-Weg ein (225).

Sowohl der Emden-Meyerhof-Weg als auch der Rapoport-Luebering-Shunt unterliegen zahlreichen Rückkopplungsmechanismen. Im Folgenden sind einige dieser „feedback“-Mechanismen aufgeführt: ATP wird als Energieträger für den membranständigen Kationentransporter $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ benötigt. Dieser Transporter bewegt drei Na^+ -Ionen im Austausch gegen zwei K^+ -Ionen aus der Zelle heraus. Bei unzureichendem Energieangebot kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Na^+ . Hohe intrazelluläre Na^+ -Konzentrationen stimulieren die Glykolyse. Erhöhte ATP-Konzentrationen inhibieren auf der anderen Seite die Phosphofruktokinase. Zudem wird durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Glukose-6-phosphat die Aktivität der Hexokinase gehemmt. Die Pyruvat-Kinase ist sensitiv gegenüber der Konzentration von Fruktose-1,6-diphosphat. 2,3-DPG und oxidiertes Glutathion (GSSG) inhibieren die Hexokinase. Bei ausreichend hoher intrazellulärer Konzentration von 2,3-DPG kann die 2,3-DPG-Mutase gehemmt werden. Zudem inhibieren Wasserstoffionen die 2,3-DPG-

Mutase und stimulieren die DPG-Phosphatase. Das bedeutet, dass eine Abnahme des pH-Wertes zu einer Verminderung der 2,3-DPG-Konzentration führt (54).

In der Nähe des NH_2 -Endes von Protein Bande 3 befinden sich Bindungsstellen für die Enzyme GADPH, Phosphofruktokinase und Aldolase. Diese glykolytischen Enzyme sind an Protein Bande 3 gebunden, sofern Hb in seiner oxygenierten Form (Oxy-Hb) vorliegt. Desoxygeniertes Hb (Desoxy-Hb) bindet hingegen an den NH_2 -Terminus von Protein Bande 3, dadurch kommt es zur Freisetzung der glykolytischen Enzyme (73). D. h. die Desoxygenierung von Hb begünstigt die Glykolyse.

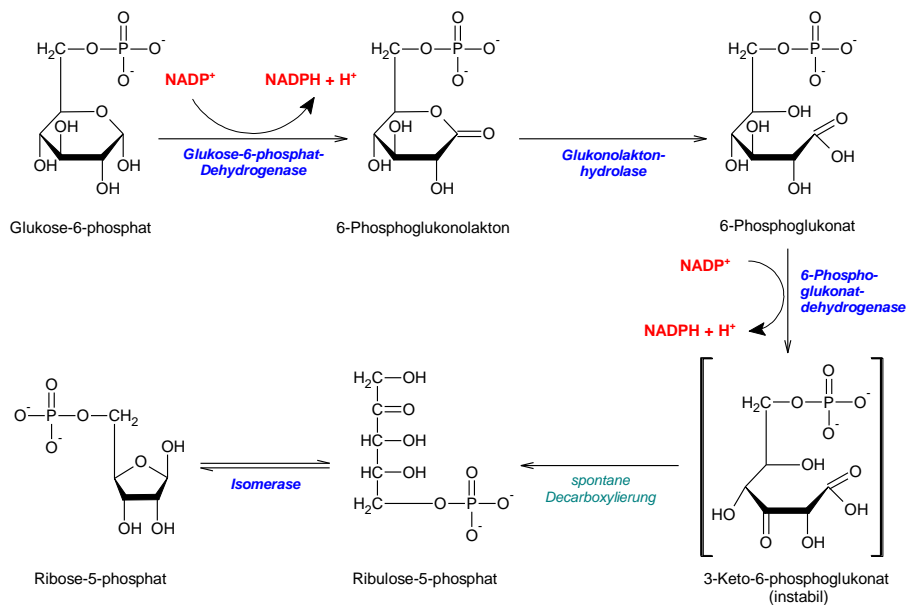


Abbildung 4: Reaktionsschritte des Pentose-Phosphat-Weges (nach Löffler 2001 (225)).

Im Pentose-Phosphat-Weg (Hexosemonophosphatweg, Pentosephosphatzyklus) wird zunächst Glukose-6-phosphat mit NADP^+ zu 6-Phosphoglukonat oxidiert. Das Enzym ist die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase. NADP^+ wird dabei zu NADPH reduziert. Aus 6-Phosphoglukonat entsteht in einer weiteren NADP^+ -abhängigen Oxidation durch das Enzym 6-Phosphoglukonatdehydrogenase die Bildung von Ribulose-5-phosphat. Hierbei wird wiederum NADP^+ zu NADPH reduziert (54, 225).

Da die kernlosen Erythrozyten über keine RNA verfügen, können sie selbst keine Purinnukleotide de novo synthetisieren. Dennoch verfügen die roten Blutzellen über einen Mechanismus, durch welchen sie aus Purinbasen Purinnukleotide synthetisieren können (54). Dazu sind sie mit zwei Enzymen des Purinnukleotid-Recyclings, der Adenosin-Desaminase und der Adenylat-Kinase ausgestattet. Die Adenosin-Desaminase katalysiert

die Umwandlung von Adenin zu Inosin. Die Adenylat-Kinase katalysiert sowohl die Reaktion $2 \text{ ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ als auch die Reaktion $\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2 \text{ ADP}$. Der Pool der Adenin-Nukleotide ist unter physiologischen Bedingungen wie folgt verteilt: ATP (85 bis 90 %), ADP (10 bis 12 %) und AMP (1 bis 3 %) (169).

1.3.3. Hämoglobin und Sauerstoffbeladung

Der in den Erythrozyten enthaltene rote Blutfarbstoff Hämoglobin nimmt die Funktion des O_2 -Transportes wahr. Des Weiteren ist Hb am Transport von CO_2 sowie von Stickoxid beteiligt und ist zudem ein wichtiges Puffersystem (226).

Das Hämoglobinmolekül von adulten Erythrozyten (Molekulargewicht 64.500 Da) besteht aus zwei Paaren ungleicher Polypeptidketten (Globinketten), von denen je eine Kette mit einem Molekül Häm verbunden ist. Zum überwiegenden Teil handelt es sich beim adulten Erythrozyten um zwei α - und zwei β -Polypeptidketten ($\text{Hb}\alpha_2\beta_2$). Ein geringer Prozentsatz (ca. 2,5 %) des adulten Hbs besteht aus zwei α - und zwei δ -Polypeptidketten ($\text{Hb}\alpha_2\delta_2$) (104). Jede Häm-Gruppe enthält ein zentrales Eisenatom (Fe^{2+}) sowie einen Porphyrinring. Beim O_2 -Transport wird O_2 reversibel über eine Oxygenierung an Fe^{2+} angelagert, ohne dass Fe^{2+} selbst oxidiert wird. Die räumliche Anordnung der Polypeptidketten führt dazu, dass das Häm vornehmlich von apolaren Gruppen umgeben wird (104, 294). Fe^{2+} befindet sich zudem in einer koordinativen Bindung (Histidin) (226). Dadurch kann eine oxidierende Wirkung der O_2 -Bindung verhindert werden (104, 294). Mit O_2 -beladenes Hb wird als Oxyhämoglobin (Oxy-Hb) bezeichnet, entladenes Hb als Desoxyhämoglobin (Desoxy-Hb).

Die O_2 -Affinität des Blutes beschreibt das Verhältnis zwischen O_2 -Druck ($p\text{O}_2$ in den Lungen oder im Gewebe) und der Beladung des Hämoglobinmoleküls mit O_2 . D. h. die O_2 -Affinität gibt an, wieviel Prozent des Hbs bei einem bestimmten O_2 -Angebot beladen sind. Der O_2 -Druck, bei dem eine 50 %ige Sättigung des Hbs erreicht ist, wird als Halbsättigungsdruck (p_{50}) bezeichnet. Dieser beträgt bei einem pH von 7,4 und einer Temperatur von 37°C bei einem gesunden Erwachsenen 26,6 mmHg (226).

Die O_2 -Anlagerung an Hb lässt sich mit einer S-förmigen Kurve, der O_2 -Dissoziationskurve bildlich darstellen. Eine effiziente Beladung mit O_2 erfolgt in den Lungen bei hohen O_2 -Partialdrücken und eine effiziente O_2 -Dissoziation erfolgt in den Geweben der Peripherie bei niedrigen O_2 -Partialdrücken. Die Geschwindigkeit der

Oxygenierung und Desoxygenierung wird durch den Halbsättigungsdruck (p_{50}) bestimmt. Ein niedriger p_{50} erhöht die pulmonale O_2 -Beladung und vermindert die periphere O_2 -Abladung. Ein hoher p_{50} erhöht die periphere O_2 -Abladung und reduziert die pulmonale O_2 -Beladung. Der steile Anteil der O_2 -Bindungskurve erlaubt, dass eine relative große Menge von O_2 bei einer nur geringen Reduktion des pO_2 abgegeben werden kann. Der pO_2 in den Kapillaren verschiedener Organe variiert mit dem O_2 -Verbrauch. Charakteristisch ist ein kooperativer Anlagerungsprozess, d. h. dass bei der Anlagerung von vier O_2 -Molekülen an das Hb sich das erste O_2 -Molekül nur sehr langsam anlagert, das zweite und das dritte wesentlich zügiger und das vierte O_2 -Molekül um mehrere 100 Male schneller (226).

Mehrere Faktoren wie der pH-Wert, die Temperatur und CO_2 beeinflussen die Dissoziationskurve. Zudem ist 2,3-DPG für die O_2 -Anlagerung von essentieller Bedeutung (226).

Hb kann in zwei verschiedenen Konformationsstatus vorliegen. In der T- (tense) Konformation hat das Hb eine relative geringe Affinität zu O_2 . In der R- (relaxed) Konformation verfügt das Hb über eine 500fach höhere Affinität gegenüber O_2 . Das Signalmetabolit 2,3-DPG wird zwischen den β -Ketten des Hämoglobins gebunden. Diese Bindung stabilisiert die T-Konformation des Hb-Moleküls. In der T-Konformation ist die O_2 -Dissoziationskurve nach rechts verschoben, die O_2 -Abgabe in den Geweben der Peripherie ist erleichtert.

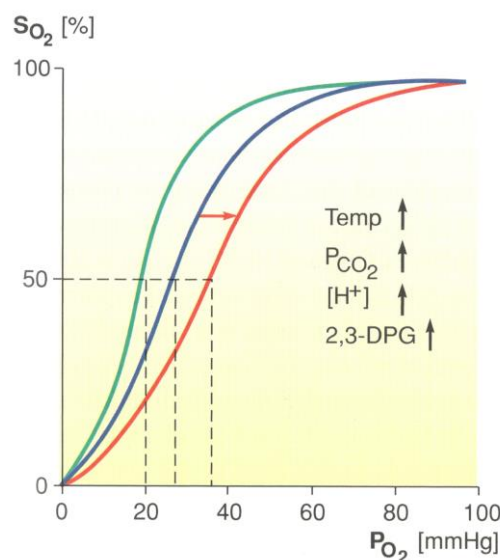


Abbildung 5: O_2 -Bindungskurve mit Darstellung der Faktoren, welche zu einer Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve führen. Rechtsverschiebung (rote Kurve) = O_2 -Affinitätsabnahme; Linksverschiebung (grüne Kurve) = O_2 -Affinitätszunahme. © 2013 Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München (107).

Die Einflüsse vom pH und $p\text{CO}_2$ werden durch den Bohr Effekt beschrieben. H^+ -Ionen binden spezifische Aminosäurereste des Hb-Moleküls und stabilisieren so die T-Konformation des Hbs. Dieses bewirkt eine Erhöhung des $p50$ und eine Rechtsverschiebung der O_2 -Dissoziationskurve mit einer erleichterten Abgabe von O_2 in der Peripherie. Physiologisch zu erklären ist dieses dadurch, dass es durch Stoffwechselprozesse mit Anfall von Laktat, O_2 -Verbrauch und Anstieg des $p\text{CO}_2$ zur Bildung von H^+ -Ionen und damit zu einer Erniedrigung des pH-Wertes in den Geweben und der Muskulatur kommt. Die Rechtsverschiebung der O_2 -Dissoziationskurve und die Abnahme der O_2 -Affinität des Hbs führen in der Folge zu einer erleichterten Abgabe von O_2 (3, 183, 294). Niedrige Temperaturen bewirken eine Zunahme der O_2 -Affinität (294).

O_2 kann von Eisen nur gebunden werden, wenn dieses als zweiwertiges Fe^{2+} vorliegt. Aufgrund kontinuierlich ablaufender oxidativer Prozesse kommt es zur Entstehung von radikalen O_2 -Spezies und Superoxiden. Ein bestimmter Anteil des Eisens wird je nach Anfall der radikalen O_2 -Spezies zu dreiwertigem Eisen (Fe^{3+} , Methämoglobin) oxidiert. Erythrozyten sind daher mit antioxidativen Schutzmechanismen ausgestattet. Neben Glutathion als wichtigsten antioxidativen Schutzmechanismus verfügen die roten Blutzellen über die Enzyme Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase, Katalase und Methämoglobin-Reduktase (Cytochrom-b5-Reduktase) (54, 83). Zudem sind u. a. Chaperone und Hitzeschockproteine in die antioxidativen Schutzmechanismen involviert (90). Die entstehenden Superoxide werden durch die Superoxid-Dismutase in H_2O_2 umgewandelt. Glutathion ist ein Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin und wird in zwei ATP-abhängigen Reaktionen synthetisiert. In reduzierter Form schützt Glutathion (GSH) die SH-Gruppen von Proteinen und Hb vor Oxidation und reduziert H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Das während dieser Reaktion oxidierte Glutathion (GSSG) wird durch die Glutathion-Reduktase mit dem Co-Faktor NADPH als H^+ -Donor (aus dem Pentose-Phosphat-Weg) in einen reduzierten Zustand zurückgeführt. Bei sehr hohen Konzentrationen von H_2O_2 kann dieses zudem durch die Katalase zu H_2O und O_2 reduziert werden (54, 226, 255, 294).

Die Reduktion von Methämoglobin (Fe^{3+}) zu Hb (Fe^{2+}) erfolgt mit dem Co-Faktor NADH als H^+ -Donor (gebildet im Embden-Meyerhof-Weg) durch die Methämoglobin-Reduktase (Cytochrom-b5-Reduktase) (54, 89, 225, 294). NADH wird dabei durch Entzug von zwei Elektronen zu NAD^+ und H^+ oxidiert (294). Ein geringer Anteil des Methämoglobins wird

auch über GSH (Glutathion) reduziert (294), insbesondere unter ausgeprägter oxidativer Beanspruchung (169).

Hb hat gegenüber Kohlenmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) eine höhere Affinität als gegenüber O₂. Sofern CO oder NO an Hb gebunden werden, sind die Erythrozyten nicht in der Lage, O₂ zu transportieren (294).

1.3.4. Rheologische Eigenschaften der Erythrozyten

Erythrozyten verfügen über die Fähigkeit, sich unter Einwirkung von Scherkräften zu verformen und in der Strömung auszurichten. Bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten oder bei Stase der Blutströmung lagern sie sich zu Aggregaten zusammen.

1.3.4.1. Verformbarkeit

Mit ihrem Durchmesser von 7,5 bis 8,5 μm können Erythrozyten Kapillaren bis zu einem Durchmesser von 2,7 μm passieren (87). Um dieses zu bewerkstelligen, sind sie in der Lage, sich schnell und in großen Ausmaßen zu verformen. Bei der Verformung bleiben das Volumen und die Oberfläche der Zellen konstant.

Die Verformbarkeit der roten Blutzellen ist im Wesentlichen abhängig von:

1. dem Verhältnis von einer relativ großen Zelloberfläche zu einem geringeren Zellvolumen
2. der relativ geringen Viskosität des Zytoplasmas
3. den viskoelastischen Eigenschaften der Membran und des Membranskelettes (24, 30, 67, 81, 84, 88, 140, 153, 251, 253, 317, 349, 355).

Ein normaler bikonkaver Erythrozyt verfügt ungefähr über ein Zellvolumen von 90 fl und eine Oberfläche von 140 μm^2 . Dieses bedeutet einen Überschuss an Zelloberfläche von ungefähr 40 % verglichen mit einer Kugel gleichen Volumens (253). Dadurch können die Zellen ihre Form verändern, ohne ihre Membran zu dehnen (88, 253). Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sowie die Konformation des Erythrozyten zählt man zu den extrinsischen Eigenschaften der Verformbarkeit (121).

Die intrinsischen Faktoren der Verformbarkeit umfassen die Materialeigenschaften der Erythrozyten, d. h. die Zusammensetzung der Membran, die Biegungs- und Dehnungssteifigkeit der Zellmembran sowie das zeitliche Verhalten der Membran in Reaktion auf Dehnungs- und Biegungskräfte (Verformung und Wiedererlangen der ursprünglichen Form). Dabei wird die Dehnungs- und Biegungssteifigkeit der Membran zu der statischen Verformbarkeit gezählt, die zeitunabhängig ist. Die Viskoelastizität der Erythrozyten ist Bestandteil der dynamischen Verformbarkeit und ist zeitabhängig (121).

Die intrazelluläre Viskosität wird überwiegend durch die intrazelluläre Hb-Konzentration bestimmt (MCHC = mean cellular hemoglobin concentration). Normalerweise beträgt die intrazelluläre Viskosität ungefähr 6 mPa.s. bei 37° C. Die intrazelluläre Hb-Konzentration

liegt zwischen 30 und 35 g/dl und kann über Veränderungen des Zellvolumens sehr genau reguliert werden. Dieses erfolgt durch die aktiven und passiven Transportprozesse über die membranständigen Transportproteine. Voraussetzung ist ein ausreichendes Energieangebot in Form von ATP für die aktiven ATPasen. Veränderungen des Verhältnisses von Zelloberfläche zu Volumen, sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme, als auch Veränderungen der intrazellulären Viskosität führen zu einer Reduzierung der Verformbarkeit (24, 253).

Die Erythrozytenmembran ist hoch elastisch (ungefähr hundertmal weicher als eine Latexmembran vergleichbarer Dicke) und kann sich unter einer Scherkraft äußerst schnell (innerhalb von 100 ms) verformen. Die Zellmembran selbst ist nicht ausdehnungsfähig. In Bezug auf ihren strukturellen Widerstand ist sie stärker als Stahl. Wesentliche Bedeutung kommt der Elastizität des Spektrin-Aktin-Netzwerkes zu. Die Spektrin-Repeats verfügen über eine bedeutende Ausdehnungsfähigkeit, Entfaltung und Zurückfaltung. Als Reaktion auf lokale Verformungen können sich bestimmte Repeats des α - und β -Spektrins auffalten und wieder schließen (80, 253). Die elastische und mechanische Stabilität des Membranskelettes wird durch die morphologische Anordnung und die Interaktionen der einzelnen Membranproteine miteinander erzielt und kann wohl zu einem gewissen Grade über Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmter Membranproteine reguliert werden (88, 220, 236). So bewirkt z. B. die Phosphorylierung von Protein Bande 4.1 eine Dissoziation von Aktin vom Membranskelett und erhöht damit die Verformbarkeit (84, 103, 235). Die Stärke der Verbindung zwischen Adducin und Aktin kann über eine von der Protein-Kinase-C und der Rho-Kinase katalysierten Phosphorylierung reguliert werden (10). Auch scheint eine Desoxygenierung von Hb zu einer passageren Dissoziation von Protein Bande 3 von Ankyrin zu führen. Dieses könnte vermutlich zu einer Zunahme der Verformbarkeit führen, was die Blutströmung in desoxygenierten Regionen erleichtern würde (335).

Fluktuationen der Zellmembran begünstigen vermutlich die Passage der Erythrozyten durch enge Kapillaren.

Durch ihre Zusammensetzung ist die Erythrozytenmembran in der Lage, unter Einfluss einer Scherungskraft frei um das Zytoplasma zu rotieren. In Analogie zu einer um ihr Fahrwerk rotierenden Panzerkette wird dieses Phänomen als „Panzerketten-Rotation“, im Englischen als „tank-treading“ bezeichnet. Die Fähigkeit zum „tank-treading“ ermöglicht

den Erythrozyten die Verformung zu Ellipsen und zur Ausrichtung entlang eines Strömungsvektors. Ohne diese Fähigkeit könnte sich der ausgedehnte Erythrozyt nicht in der Strömung orientieren und würde vielmehr trudeln (153). Zudem reduziert sich durch das „tank-treading“ der hydraulische Widerstand (88, 140, 317). Nach Verformung erreichen die Zellen ihre ursprüngliche bikonkave Form über den „tank-treading“-Mechanismus wieder. Es besteht vermutlich ein Zellformgedächtnis, d. h. bestimmte Anteile der Zellmembran bilden den Rand des Diskozyten, während andere Anteile der Membran die Eindellung in der Mitte des Diskozyten formen (131).

Zudem bestehen wohl weitere Möglichkeiten, die Stabilität und die Verformbarkeit bzw. das Volumen der Erythrozyten aktiv zu steuern. Neben der Phosphorylierung bestimmter Membranproteine kann durch externe, auf die Erythrozyten wirkende Scherkräfte und die dadurch induzierten lokalen Verformungen der Zellmembran die Permeabilität der Membran für Ca^{2+} -Ionen erhöht werden. Infolge der erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird der Gardos-Kanal aktiviert. Dieser Kanal initiiert einen selektiven Ausstrom von K^+ aus der Zelle, sekundär folgt die Aktivierung weiterer Anionenströme durch andere Kanäle. Mit dem Kationenausstrom geht konsekutiv ein osmotischer Wasserverlust einher, das Zellvolumen nimmt ab. Über diesen Mechanismus lässt sich so kurzfristig und reversibel aktiv das Zellvolumen regulieren (114). Der Gardos-Kanal kann vermutlich auch durch Prostaglandin E_2 stimuliert werden (218). Die Bindung von Complement-Rezeptor 1 (CR1) begünstigt einen Ca^{2+} -Einstrom in die Erythrozyten und induziert möglicherweise die Phosphorylierung von Adducin und β -Spektrin (144).

1.3.4.2. Aggregation

Eine weitere Eigenschaft der Erythrozyten besteht darin, sich bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten bzw. bei Stase der Blutströmung reversibel binnen Sekunden zu Aggregaten zusammenzulagern. Dabei kommt es zunächst durch eine lineare Kopf-an-Kopf Anlagerung der Erythrozyten zu einer „Geldrollen“-artigen Formation, der sogenannten Rouleaux-Bildung. Im Verlauf können sich durch weitere End-zu-End, Seit-zu-End und Seit-zu-Seit Anlagerungen zunächst zweidimensionale, später dreidimensionale Aggregate bilden (21, 32, 35, 151).

Entscheidend für die Ausbildung von Aggregaten ist die Anwesenheit von Makromolekülen im suspendierenden Medium (265, 293, 395). Das Ausmaß der Aggregation hängt sowohl von der Konzentration der Makromoleküle als auch von deren molekularem Gewicht ab (24). Aufgrund seiner molekularen Größe als auch seiner

konzentrationsmäßigen Vertretung kommt Fibrinogen dabei die größte Bedeutung im humanen Plasma zu (24, 25, 30, 41, 82, 239, 293). Ebenfalls können die Plasmaproteine α 2-Makroglobulin, IgM und IgG die Aggregation induzieren, jedoch ist ihre Konzentration unter physiologischen Bedingungen so gering, dass ihnen keine wesentliche Bedeutung zukommt (24). Zu experimentellen Zwecken kann mit Dextranen unterschiedlicher Molekulargewichte die Aggregation induziert werden.

Wichtig für die Aggregation scheinen zudem die Form der Erythrozyten sowie deren Verformbarkeit zu sein. Denn sowohl eine Veränderung der Erythrozytenform von dem bikonkaven Diskozyten zu einem Echinozyten oder Sphärozyten als auch eine Reduzierung der Verformbarkeit führt zu einer Abnahme der Aggregation. Bei der Aggregation muss ein äußerst enger Kontakt zwischen den einzelnen Erythrozyten bestehen. Dieser enge Kontakt wird durch die Verformbarkeit der Zellen erleichtert (24). Im Gegensatz dazu wirkt wahrscheinlich die negative Oberflächenladung der Erythrozyten der Aggregation entgegen. Künstliche Verminderung der negativen Oberflächenladung verstärkt dagegen die Aggregation (32).

Der pathophysiologische Ablauf der Aggregation ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es werden zwei Hypothesen diskutiert, das *Bridging*-Modell und das *Depletions*-Modell. Nach dem *Bridging*-Modell kommt es zur Aggregation, wenn sich große, langkettige Makromoleküle wie Fibrinogen oder hochmolekulare Dextrane an der Oberfläche benachbarter Zellen adsorbieren. Diese Adsorption von Makromolekülen führt zu „brückenbildenden Kräften“. Sofern diese „bridging-forces“ die disaggregierenden Kräfte wie die elektrostatische Abstoßung (Repulsion) aufgrund der negativen Oberflächenladung der Zellmembran, die Membranverformung bzw. die elastische Energie der Zellmembran und die Scherungskräfte der Strömung übersteigen, kommt es zur Ausbildung von Aggregaten (30, 35, 41, 60, 395).

Nach dem *Depletions*-Modell ist die Konzentration von Makromolekülen, Proteinen oder Polymeren in unmittelbarer Nähe der Erythrozytenzelloberfläche niedriger als die Protein- und/oder Polymerkonzentration im gesamten suspendierenden Medium. Dadurch vermindert sich der osmotische Druck in unmittelbarer Nähe der Erythrozytenoberflächen, die Flüssigkeit wandert ab in Richtung der höheren osmotischen Drücke mit der Folge, dass sich benachbarte Erythrozyten zusammenlagern (32, 35, 41, 60, 265). Das *Depletions*-Modell wurde vor annähernd 60 Jahren von Asakura und Oosawa vorgestellt (32). Es ist bis jetzt nicht mit Sicherheit zu sagen, welche der beiden Mechanismen in der

Realität wirklich zutreffen. In jüngerer Zeit vermehren sich jedoch Hinweise für die Richtigkeit des *Depletions*-Modelles (32, 35, 41, 246, 263-265, 267).

1.4. Mikrozirkulation und Blutströmung

Die treibende Kraft der Blutströmung ist die regelmäßige Pumpleistung des Herzens, d. h. das Herzzeitvolumen (HZV). Die Versorgung der Organe mit O_2 und Nährstoffen sowie der Abtransport von CO_2 und metabolischen Endprodukten erfolgt über die Gefäße der Mikrozirkulation. O_2 und CO_2 werden zwischen Erythrozyten und Geweben durch Diffusion ausgetauscht. Unter der Mikrozirkulation versteht man ein weit verzweigtes Gefäßsystem mit zahlreichen seriellen und parallelen Gefäßverbindungen. Dazu gehören kleine Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und kleine Venen mit einem Durchmesser bis zu 300 μm (316). Viele der Gefäße sind so klein, dass Erythrozyten sie nur aufgrund ihrer außergewöhnlichen Verformbarkeit passieren können. Kennzeichnend für die Gefäße der Mikrozirkulation ist deren unregelmäßiger Verlauf. Es bestehen unterschiedlich lange Gefäße mit inhärenten Formveränderungen. Die Durchmesser der Gefäße variieren beträchtlich im Gefäßverlauf. An zahlreichen Gefäßabzweigungen kommt es zu Abgängen von Tochtergefäßen. Es bestehen vielzählige Querverbindungen, Shunts und parallele Strömungsbahnen (305, 315).

Vereinfacht ausgedrückt ist die Blutströmung durch das mikrozirkulatorische Gefäßnetzwerk von den Strömungswiderständen in den einzelnen Gefäßsegmenten abhängig. Die Strömung durch ein Segment ist dabei nicht nur abhängig von dem Strömungswiderstand in diesem einen Segment, sondern auch von den Widerständen in parallel geschalteten Gefäßen. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille verhält sich das Blutströmungsvolumen proportional zur vierten Potenz des Gefäßdurchmessers. So führt z. B. eine Verringerung des Gefäßdurchmessers um 10 % zu einer Verminderung des Strömungsvolumens um 44 % (30, 315).

Das Gesetz von Hagen-Poiseuille beschreibt die Strömungsvolumen Q wie folgt:

$$Q = \frac{(\pi \times \Delta P \times r^4)}{(8 \times L \times \eta)}$$

dabei ist η die scheinbare Viskosität des Blutes, L die Länge des Gefäßes, r der Durchmesser des Gefäßes und ΔP der Druckabfall.

Als eine nicht-newtonische Flüssigkeit verfügt Blut über eine scheinbare Viskosität (Strukturviskosität), d. h. mit zunehmender Scherungsgeschwindigkeit nimmt die Blutviskosität ab und bei abnehmender Scherungsgeschwindigkeit erhöht sich die Blutviskosität (30, 33). Diese auch im Englischen als „shear thinning“ beschriebene Eigenschaft wird überwiegend durch die Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten bedingt, zu einem gewissen Grade auch durch die Verformbarkeit der Erythrozyten (33, 87, 186, 293). Daneben beeinflussen der Hämatokrit und die Viskosität des Blutplasmas die Blutviskosität (87). Der Effekt der Aggregation auf die scheinbare Viskosität wird hauptsächlich durch die Ansammlung von größeren Partikeln (sich ausbildende und größer werdende Aggregate) bei abnehmender und niedriger Strömungsgeschwindigkeit hervorgerufen, d. h. die Aggregation bestimmt die Blutviskosität hauptsächlich bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten (33, 60, 87, 195). Aufgrund der Fähigkeit zur Verformung können sich die Erythrozyten in der Strömung ausrichten. Insbesondere bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten beeinflussen die Verformbarkeit und die Orientierung der Erythrozyten in der Strömung die Blutviskosität (30, 87).

In der Blutströmung begünstigt die Aggregationsfähigkeit eine axiale Migration der Erythrozyten in das Zentrum des Blutflusses sowohl *ex vivo* in Röhrchen als auch *in vivo* in Blutgefäßen (37, 59, 87). Durch die axiale Ansammlung der Erythrozyten im Zentrum kommt es zur Ausbildung einer zellarmen bzw. zellfreien Plasmalage entlang der Gefäßwand („Phasenseparation“) (59, 87, 195). Der Hämatokrit und die Viskosität sind in der Plasmalage reduziert. Dadurch ist der Strömungswiderstand in der Nähe der Gefäßwand vermindert (37). Durch den geringeren Strömungswiderstand in den Randbereichen der Strömung können die Erythrozyten im Zentrum der Blutströmung schneller fließen. Das Geschwindigkeitsprofil von Strömungen in Röhrchen kann mit der Navier-Stokes-Gleichung beschrieben werden. Annähernd parabolisch lässt sich darstellen, dass die Strömungsschichten im Zentrum der Strömung mit höheren Geschwindigkeiten fließen

als die Strömungsschichten in den Randbereichen (37). Diese Geschwindigkeitsverteilung erklärt die Beobachtung, dass der in einem kleinen Röhrchen/Gefäß gemessene Hämatokrit geringer ist als der Hämatokrit des Blutes bei Eintritt in das Gefäß und bei Austritt aus dem Gefäß. D. h. das Blut in den zuführenden und in den abführenden Gefäßen hat einen höheren Hämatokrit als das Blut innerhalb des Gefäßes. Nach seinem Erstbeschreiber wurde dieses Phänomen als „Fåhræus-Effekt“ benannt und bezieht sich auf Röhrchen/Gefäße mit einem Durchmesser von weniger als 300 μm (87, 316).

Eine weitere Besonderheit der Blutströmung in kleinen Röhrchen/Gefäßen mit einem Radius zwischen 3 μm und 300 μm ist, dass die scheinbare (apparente) Viskosität des Blutes mit sich verringerndem Gefäßdurchmesser abnimmt. Dieses Phänomen wird als „Fåhræus-Lindqvist-Effekt“ bezeichnet. Der Effekt wird bei sehr kleinen Gefäßdurchmessern unterhalb von 3 μm umgekehrt, d. h. unterhalb dieses Gefäßdurchmessers kommt es zu einem exponentiell starken Anstieg der scheinbaren Viskosität (87, 316).

Die Ausbildung der gefäßwandnahen zellarmen bzw. zellfreien Plasmalage führt bei den zahlreichen Gefäßabzweigungen und an Bifurkationen zu einer Ungleichverteilung des Hämatokrits auf die Tochtergefäße. Tochtergefäße werden vornehmlich durch die marginale Blutströmung und nicht durch die gesamte Strömung in dem Muttergefäß gespeist. Je nach Lage und Größe der abzweigenden Tochtergefäße dominiert in ihrem Zufluss ein jeweils größerer Anteil von Erythrozyten oder von Plasma. Dieses Phänomen wird als „plasma-skimming“ bezeichnet (37, 87, 316). „Fåhræus-Effekt“ und „plasma-skimming“ tragen dazu bei, dass der Hämatokrit in den Gefäßen der Mikrozirkulation geringer ist als in den Gefäßen der Makrozirkulation (37).

Die Regulation der Blutströmung in der Mikrozirkulation ist den metabolischen Bedürfnissen der Gewebe und Organe angepasst. Neben dem HZV bestehen unterschiedliche, miteinander interagierende Mechanismen, die den Blutfluss in der Mikrozirkulation regulieren. Gemeinsam werden diese Mechanismen als Autoregulation bezeichnet und umfassen myogene, scherungsabhängige und metabolische Anteile (76). Dabei sind nur die Arterien und Arteriolen von einer glatten Gefäßmuskulatur umgeben, welche durch Kontraktion oder Relaxierung den Gefäßdurchmesser verändern kann.

Endothelzellen verfügen über Mechanosensoren, welche als Reaktion auf Scherung unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren (132). Durch Scherung an der Gefäßwand kommt es zur Stimulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Dieses führt zur

Synthese von NO, welches freigesetzt wird und an der glatten Gefäßmuskulatur eine Relaxation bewirkt (24). Ebenfalls als Reaktion auf eine Gefäßwandscherung kann von den Endothelzellen ATP in das Gefäßlumen freigesetzt werden. ATP bewirkt über Aktivierung purinerner Rezeptoren an den Gefäßendothelzellen auch eine Vasodilatation (227). Zunehmende Wandscherung führt so zu einer Gefäßweitstellung. Scherungskräfte werden hauptsächlich über eine das Endothel bedeckende Lage aus Makromolekülen, der sogenannten ESL (endothelial surface layer) an die Gefäßendothelzellen vermittelt. Neben NO sind die Gefäßendothelzellen auch zur Synthese und Freisetzung weiterer vasoaktiver Substanzen fähig. Hierzu zählen u. a. Adenosin, EDHF (endothelium derived hyperpolarizing factor) und Prostaglandine (132, 299, 305, 315).

Erhöhter intravasaler Druck hingegen provoziert eine myogene Reaktion der Gefäßmuskulatur, die darauf durch Kontraktion das Gefäßlumen verengt. Ebenso beeinflussen neuronale Signale aus in der Nähe von Gefäßen endenden Nerven den Tonus der Gefäßmuskulatur (nervale Autoregulation). Vermutlich werden von den Geweben und Organen vasoaktive metabolische Stimuli auf ein sich verändernden pO_2 abgesondert (315). CO_2 , welches proportional zum O_2 -Verbrauch gebildet wird, verfügt ebenfalls über vasokative Funktionen (299). Zudem hat vermutlich der pO_2 einen direkten Einfluss auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur. Experimentell zeigte sich eine Kontraktion der Arteriolen, sofern in ihrer Umgebung die O_2 -Konzentrationen anstiegen (315). Bei einem niedrigen pO_2 wird eine Vasodilatation initiiert (3).

Eine wesentliche Rolle bei der Autoregulation spielen zudem die Erythrozyten. Sie produzieren und transportieren NO und ATP, welche als Reaktion auf eine niedrige O_2 -Konzentration von den Erythrozyten freigesetzt werden können (24, 117, 287). Die Abgabe von ATP aus den Erythrozyten erfolgt wahrscheinlich zudem als Reaktion auf Scherung und Verformung der roten Blutzellen (134).

Da die Freisetzung von NO und ATP zumeist in den Regionen mit niedrigem pO_2 erfolgt, d. h. v. a. in den Kapillaren und Venolen, diese aber nicht von einer glatten Gefäßmuskulatur umgeben sind, muss davon ausgegangen werden, dass Mechanismen einer stromaufwärts zu den Arterien und Arteriolen gerichteten Informationsfortleitung bestehen (305). Der Informationstransfer erfolgt wahrscheinlich über „gap junctions“ zwischen den Endothelzellen (183).

Dank der sehr effizienten Autoregulation kann die mikrozirkulatorische Blutströmung über einen weiten Bereich auch bei Änderung des Perfusionsdruckes aufrechterhalten werden. Über die lokale Kontrolle des Blutflusses kann die Perfusion auf den O_2 -Bedarf abgestimmt werden (315). Aufgrund der Phasenseparation und die dadurch bedingte ungleiche Verteilung des Hämatokrits auf einzelne Gefäße besteht z. T. eine große Heterogenität des O_2 -Angebotes. Möglicherweise begünstigt ein interkapillärer O_2 -Austausch per Diffusion eine homogene O_2 -Versorgung des Gewebes (117, 287).

Die Physiologie der Mikrozirkulation, insbesondere deren Autoregulation ist äußerst komplex. Bis heute ist nicht genau verstanden, wie die einzelnen Mechanismen untereinander interagieren und welchem dieser Mechanismen eine stärkere Bedeutung als den anderen Mechanismen zukommt. Zahlreiche experimentelle und theoretische Modelle bestehen. Bis heute unterliegen experimentelle Studien der Mikrozirkulation jedoch in der Möglichkeit ihrer Methoden gewissen Limitationen.

2. Fragestellung

Während der konventionellen Blutsammlung sind die Erythrozyten in den ersten Millilitern des gewonnenen Blutes einer hohen Konzentration der Antikoagulanzlösung ausgesetzt. Die Antikoagulanzlösungen sind in den Blutsammelbehältnissen vorgelegt und vermischen sich während der Sammlung mit dem Blut. Gibson et al. beobachteten 1956 nach Blutsammlung und Lagerung in der Antikoagulanzlösung ACD (Acid, Citrat, Dextrose), dass die Erythrozyten in den ersten 100 ml des gesammelten und mit der in der Blutkonserve vorgelegten Antikoagulanzlösung vermischten Vollblutes nach einer 28-tägigen Lagerungszeit ein deutlich geringeres Überleben nach erfolgter Transfusion im Empfängerorganismus aufweisen als der Durchschnitt aller Erythrozyten der gesamten Transfusionseinheit (142). Das 24-Stunden-Überleben post transfusionem betrug bei Erythrozyten der ersten 100 ml zwischen 20 bis 32 %, das der gesamten Transfusionseinheit zwischen 44 und 61 % (142, 199). Diese Beobachtung wurde später von anderen Untersuchungsgruppen für das Konservierungsmedium ACD bestätigt (242, 243) und prägte den Begriff des Sammlungsschadens („lesion of collection“).

Neben der konventionellen Blutsammlung über eine Blutsammlungswaage können sowohl Vollblut als auch Blutbestandteile wie Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, Plasma und Gerinnungsfaktoren mit einer Apheresetechnik über Zellseparatoren gewonnen werden. Hierbei wird das gesammelte Blut kontinuierlich in einem konstanten Verhältnis mit einer Antikoagulanzlösung vermischt. Matthes et al. untersuchten die Qualität von mit dem Zellseparator MCS 3P® (Haemonetics Corp., Braintree, MA, USA) gewonnenen Blutprodukten. Als Referenz galten in der Literatur publizierte Qualitätsparameter konventionell gesammelten Blutes. Dabei zeigte sich nach Blutgewinnung mit dem Zellseparator MCS 3P® eine bessere und längere Bewahrung der Konzentrationen von ATP und 2,3-DPG bei 42 Tage in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten. Matthes et al. führten diese Ergebnisse auf die Vermeidung des Sammlungsschadens durch die Anwendung der Apheresetechnik zurück (199, 240).

Die ABC®-Waage (Automated Blood Collection, MacoPharma, Tourcoing, Frankreich) gewährleistet ebenfalls durch kontinuierliches Zuführen der Antikoagulanzlösung ein adäquates Verhältnis von gesammeltem Vollblut zur Antikoagulanzlösung. Dadurch werden mögliche negative Effekte durch 1. einen Überschuss an vorgelegter Antikoagulanzlösung in den ersten Millilitern der Blutspende als auch 2. ein nicht adäquates

Verhältnis von Antikoagulanzlösung zu Vollblut bei Nichterreichen oder Überschreiten des angestrebten Sammelvolumens von ungefähr 450 ml vermieden.

Mit der hier vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob durch eine kontinuierliche Applikation der Antikoagulanzlösung CPDA-1 zum gesammelten Vollblut mittels der ABC[®]-Waage die Qualitätsparameter des Blutes besser bewahrt werden als durch die Blutsammlung über eine konventionelle Blutwaage, d. h. ob durch kontinuierliches Zuführen von CPDA-1 zum Vollblut ein Sammlungsschaden vermieden bzw. reduziert werden kann.

In jüngerer Zeit ergaben sich Hinweise, dass Veränderungen der rheologischen Eigenschaften von Erythrozyten zu einer Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und der O₂-Versorgung der Gewebe und Organe im Empfängerorganismus führen könnten. Möglicherweise sind Veränderungen der rheologischen Eigenschaften während der Blutlagerung mitverantwortlich für eine erhöhte Morbidität und Mortalität, die nach Transfusionen bei einigen Transfusionsempfängern beobachtet werden konnten. Daher wurden in dieser Studie neben den geläufigen Qualitätsparametern der Blutlagerung auch die Verformbarkeit und die Aggregation der Erythrozyten untersucht.

Die Verwendung von leukozytendepletiertem Vollblut ist in der Bundesrepublik Deutschland und den Ländern der Europäischen Union der autologen Bluttransfusion vorbehalten (71). Hingegen wird in weniger entwickelten Ländern Vollblut weiterhin auch für die allogene Transfusion verwendet (115, 262, 275). Zudem rückt in jüngerer Zeit auch in Industriestaaten die Verwendung von allogenen Vollbluttransfusionen im Rahmen von Massivtransfusionen, einer massiven Hämorrhagie, im schweren hämorrhagischen Schock als auch bei einer Koagulopathie wieder ins Interesse (257, 338, 398). Daher bestand die Frage, ob die Plasma-Qualität von Vollblut sich bewahren bzw. verbessern ließe, da diese der Qualität von therapeutischem Plasma (fresh frozen plasma) unterlegen ist.

3. Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde als randomisierte Kontrollstudie konzipiert. Zu untersuchen galt der Einfluss einer neuartigen Blutentnahmetechnik auf die Qualität von gelagerten leukozytendepletierten Vollblutkonserven. Als Kontrolle diente die konventionelle Blutentnahmetechnik. Hierzu wurden zwei Gruppen aus jeweils 20 Untersuchungseinheiten gebildet. Eine Untersuchungseinheit entsprach einer Vollblutkonserve. Aus Gründen der Optimierung von Labor- und Zeitkapazitäten erfolgte die Unterteilung in zehn Untergruppen von jeweils vier Untersuchungseinheiten. Die mittels der neuartigen Blutentnahmetechnik gewonnenen Blutkonserven werden nachfolgend als ABC-Gruppe zusammengefasst, die herkömmlich hergestellten Konserven als konventionelle Gruppe.

Die Untersuchung der jeweiligen Blutkonserven erstreckte sich über einen Zeitraum von 49 Tagen. An den Lagerungstagen 1, 7, 21, 35, 42 und 49 wurden die Werte folgender Parameter im Vollblut bestimmt: pH-Wert, ATP, 2,3-DPG, Hämoglobin, Hämatokrit, Verformbarkeit und Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten. Zudem wurde an den jeweiligen Messtagen Plasma für die Bestimmung von freiem Hämoglobin, Glukose, Kalium sowie Gerinnungsparametern gewonnen und tiefgefroren. Letztere Untersuchungen wurden gesammelt und außerhalb der offiziellen Messtage in Serie untersucht. Am ersten Untersuchungstag wurde einmalig der Restleukozytengehalt der leukozytendepletierten Vollblutkonserven bestimmt. Zudem wurden die beiden Gruppen hinsichtlich der Präzision des durch die Blutwaagen erzielten Spendevolumens, der Dauer der Blutspende und der Dauer der Leukozytendepletion verglichen.

Die Untersuchungskriterien richteten sich nach nationalen und internationalen Qualitätsstandards für gelagerte Blutprodukte und tiefgefrorenes Plasma (FFP: fresh frozen plasma) (70, 120). Lediglich für die rheologischen Bestimmungen existierten und existieren keine verbindlichen Richtlinien.

Die Studie wurde vor Studienbeginn von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg anerkannt.

3.1. Studiengröße

Der Kalkulation der Fallzahl für diese Studie lag zugrunde, eine vor Testbeginn bestimmte Differenz des ATP-Gehaltes am 42. Lagerungstag zwischen den beiden Untersuchungsgruppen bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und einer Power von 80 % ($\beta = 20$ %) zu detektieren (308). Die Berechnung erfolgte anhand nachstehender Formel:

$$n \geq \frac{2\sigma^2}{\delta^2} \times (t_{v;1-\alpha/2} + t_{v;1-\beta})^2$$

Dabei beträgt die festgelegte ATP-Differenz zwischen ABC- und konventioneller Gruppe $\delta = 0,4 \mu\text{mol/g Hb}$. Für die Standardabweichung (σ) von ATP wurde ein Wert von $0,4 \mu\text{mol/g Hb}$ angenommen. $t_{v;1-\alpha/2}$ kennzeichnet das zweiseitige Quantil der t-Verteilung bezogen auf das Signifikanzniveau α und beträgt 1,96. Der Betrag des Quantils der t-Verteilung für die Power $t_{v;1-\beta}$ liegt bei 0,8. Demzufolge ergab sich eine Fallzahl von ungefähr 16 Spendern pro Gruppe. Die Zahl wurde auf 20 Blutspender erhöht, um Protokollverletzungen und dem Verlust von Blutkonserven vorzubeugen.

3.2. Die Blutspender

Die Vollblutkonserven stammten von 40 Blutspendern. Die eingeschlossenen Blutspender waren als mehrfache Blutspender in der Blutspende-Datenbank des Institutes für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Universität Marburg registriert. Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie waren, neben den gesetzlich festgelegten Spendeignungskriterien für Blutspender, die Zugehörigkeit zur Blutgruppe 0 Rh positiv oder A Rh positiv sowie Hb-Werte von mindestens 125 g/l für Frauen und mindestens 135 g/l für Männer in den beiden vorangegangenen Blutspenden.

Nach Aufklärung durch den Studienleiter und schriftlicher Zustimmung der Blutspender zu der Teilnahme an der Studie folgte die Randomisierung der Studienteilnehmer in vier Blöcke von zehn Männern Blutgruppe A, zehn Männern Blutgruppe 0, zehn Frauen Blutgruppe A und zehn Frauen Blutgruppe 0 auf die beiden Untersuchungsgruppen. Dabei wurde sichergestellt, dass die Verteilung von Geschlecht und Blutgruppe in beiden Untersuchungsgruppen identisch war.

3.3. Die Waagen

3.3.1. ABC®-MacoPharma-Waage

Bei der ABC®-Waage handelt es sich um ein portables automatisiertes Blutentnahmegesetz, welches von der Firma MacoPharma (Tourcoing, Frankreich) entwickelt wurde. Der Name ABC® steht hierbei für **A**utomated **B**lood **C**ollection.



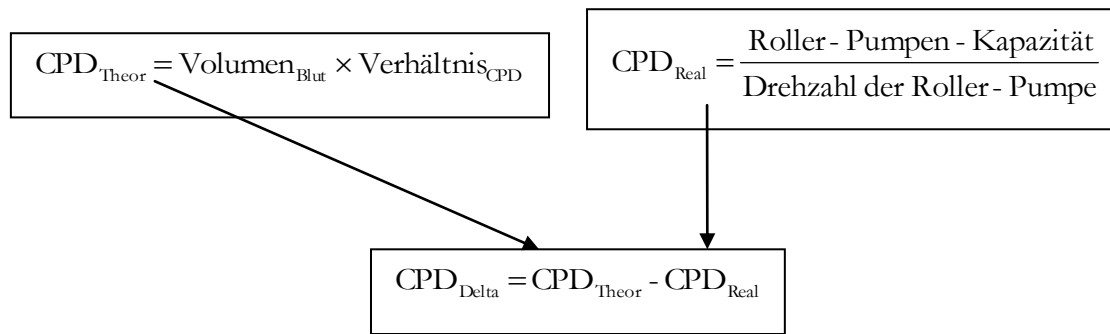
Abbildung 6: ABC®-MacoPharma-Waage mit eingelegetem Blutbeutelssystem, © MacoPharma.

Die ABC®-Waage wurde für die gravimetrische Blutentnahme konstruiert. An innovativer Technologie verfügt das Gerät über ein Roller-Pumpsystem, das die antikoagulierende Citratlösung kontinuierlich dem Spendeblutfluss in einem Verhältnis von 1 : 7 zuführt (siehe Abb. 7). Die Antikoagulanzlösung CPDA-1 befindet sich nicht, wie bei den konventionellen Systemen, im Blutentnahmebeutel vorgelegt, sondern in einem separat an das Blutbeutelssystem angeschlossenen Satellitenbeutel (siehe Abb. 8). Ein Kippsystem wie bei den konventionellen Blutentnahmewaagen zur Durchmischung von Blut und Antikoagulanzen ist bei diesem System nicht nötig. Das vollständige Beutelsystem befindet sich einschließlich des mit CPDA-1-Antikoagulanzlösung bestückten Satellitenbeutels während der Blutspende auf einer in das Gerät integrierten Waagschale (siehe Abb. 6).



Abbildung 7: Das integrierte Roller-Pumpsystem der ABC®-MacoPharma-Waage mit zwei optischen Sensoren zur Überwachung des Blutflusses. Zu sehen ist das Y-Stück des Schlauchsystems. In der linken Bildhälfte: Der Entnahmeschlauch ist in eine Klemme zur automatischen Unterbindung des Spendeflusses eingelegt. © MacoPharma.

Über den im Folgenden beschriebenen Algorithmus wird die Zufuhr der Antikoagulanzlösung über die Roller-Pumpe geregelt. Aus der Differenz der insgesamt zuzuführenden CPDA-1-Menge (CPD_{Theor}) und der tatsächlich applizierten Antikoagulanzmeng (CPD_{Real}) wird der Wert CPD_{Delta} kalkuliert, welcher als Parameter für die Steuerung des Roller-Pumpen-Motors dient. Die Gerätesoftware konvertiert CPD_{Delta} in den Drehwinkel der Pumpe. Die Geschwindigkeit des Roller-Pumpen-Motors verhält sich dem Drehwinkel proportional. Je größer der Unterschied zwischen CPD_{Theor} und CPD_{Real} bzw. je größer CPD_{Delta} ist, desto schneller wird die Pumpe angetrieben; umgekehrt verhält es sich bei kleinem CPD_{Delta} . Damit lässt sich die Antikoagulanzzufuhr dem realen Blutfluss in Echtzeit anpassen.



wobei:

$\text{Verhältnis}_{CPD} = 0,14$

$\text{Volumen}_{Blut} = \text{Masse}_{Blut} / \text{Dichte}_{Blut}$

$\text{Roller-Pumpen-Kapazität} =$ Menge an ml Antikoagulanzlösung, die pro Umdrehung von der Roller-Pumpe transportiert wird. Die Kapazität wird durch den Aufbau der Pumpe sowie durch die Abmessungen des Blutentnahmeschlauches determiniert.

Das erwünschte Spendevolumen lässt sich bei der ABC[®]-Waage individuell über den Gerätecomputer programmieren. Sobald das Zielspendevolumen gesammelt ist, wird die Spendeblutzufuhr automatisch durch Abklemmen des Entnahmeschlauches beendet (siehe Abb. 7). Die ABC[®]-Waage ist sowohl für den stationären als auch den portablen Gebrauch ausgerichtet. Die Benutzerfreundlichkeit profitiert von optionalem Batteriebetrieb, Barcode-Lesegerät und einer Reihe an Datenübertragungsmöglichkeiten via Kabel, Funkverbindung und RFID (Radio Frequency Identification) (57).

3.3.2. Compomixer M2[®]

Der Compomixer M2[®] (Fresenius HemoCare, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) ist eine konventionelle Blutentnahmewaage, bei der mithilfe der Schwerkraft Spendeblut in einen mit CPDA-1-Antikoagulanzlösung vorgelegten Beutel fließt. Dieser liegt auf einer Waagschale, die zwecks Vermischung der Antikoagulanzlösung mit dem Blut automatisch Schaukelbewegungen ausführt. Bei Erreichen des erwünschten Spendevolumens, gemessen über die integrierte Waage, wird der blutzuführende Schlauch automatisch abgeklemmt und die Spende somit beendet.

3.4. Das Beutelsystem

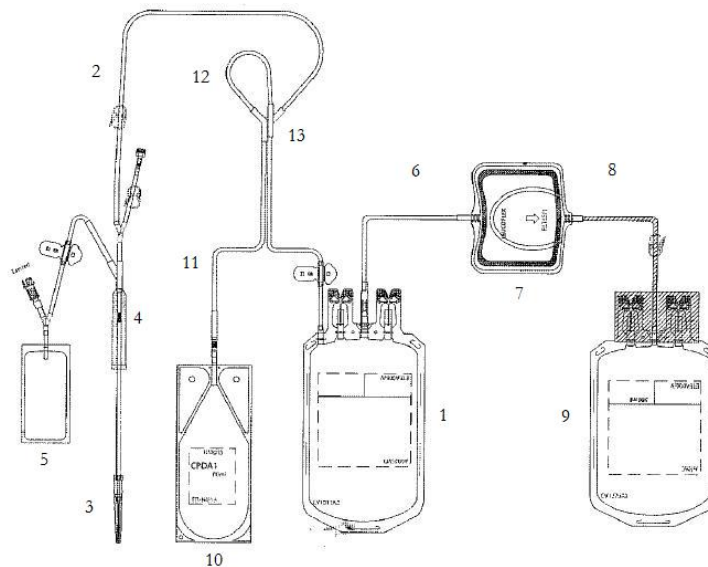


Abbildung 8: MacoPharma DDG-System mit CPDA-1 Satellitenbeutel.
© MacoPharma.

Die Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des MacoPharma Blutbeutelsystems DDG. Dabei handelt es sich um ein geschlossenes steriles System. Zur Aufnahme des Spendeblutes ist ein kollabierbarer Blutsammelbeutel (Volumen ca. 500 ml) **(1)** vorgesehen. Der Einlass dieses Blutsammelbeutels ist mit einer 80 cm langen Blutentnahmeleitung verbunden **(2)**. An dem freien Ende der Blutentnahmeleitung befindet sich eine 16 G Kanüle **(3)**, die zur Entnahme des Vollblutes dient. Im Sinne der Prävention vor Stichverletzungen lässt sich die SevuVam-Vorrichtung **(4)** nach erfolgter Spende über der Kanüle arretieren. Zur Reduktion potentiell bakterieller Kontamination der ersten ml Spendeblut ist eine Probenahme von maximal 50 ml in den BactiVam-Beutel **(5)** möglich. Mit dem sogenannten „predonation-sampling“ lassen sich vor und während der Spende über einen Adapter aus dem BactiVam-Beutel Blutproben abnehmen. Von dem Auslass des Blutsammelbeutels **(1)** führt ein erster Teil einer Vollblutleitung **(6)** zu dem Einlass des Leukozytenfilters Leucoflex LST 1 **(7)**. Seiner Beschreibung ist ein eigener Abschnitt eingeräumt (siehe Kapitel „Der Leukozytenfilter“). Von dem Auslass des Leukozytenfilters nimmt ein zweiter Teil der Vollblutleitung **(8)** seinen Ausgang und führt zu dem Einlass eines ca. 500 ml fassenden kollabierbaren Beutels zur Aufnahme des filtrierten Vollblutes **(9)**. Mittels mechanischer Plastikclips kann der Blutfluss an verschiedenen Stellen unterbrochen werden.

Im Beutelsystem zur konventionellen Blutabnahme (MacoPharma REF: DD7500FC) sind 63 ml CPDA-1-Antikoagulanzlösung im Blutsammelbeutel vorgelegt. Bei dem für die

ABC[®]-Waage vorgesehenen Blutbeutelsystem (MacoPharma REF: DDG9500FC) befinden sich 80 ml CPDA-1-Antikoagulanzlösung in einem Satellitenbeutel **(10)**. Von dem Auslass dieses Satellitenbeutels geht eine Antikoagulanleitung **(11)** ab, die an ihrem Ende eine Schlauchschleife **(12)** bildet. Letztere ist zur Einlage in das Roller-Pumpen-System der ABC[®]-Waage bestimmt. Über ein Y-Stück **(13)** mündet die Antikoagulanleitung schließlich in die Blutentnahmeleitung **(2)**. Tabelle 1 beschreibt die Zusammensetzung der CPDA-1-Lösung.

CPDA-1

Substanz	Konzentration
Natriumcitrat	26,300 g
Citronensäuremonohydrat	3,270 g
Glukosemonohydrat	31,900 g
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat	2,510 g
Adenin	0,275 g

Tabelle 1: Die Zusammensetzung der CPDA-1 Lösung (256).

3.5. Der Leukozytenfilter

Der Leukozytenfilter Leukoflex LST 1 (MacoPharma) ist als Inline-Tiefenfilter in das Beutelsystem integriert. Die Filtration erfolgte gravimetrisch. Insgesamt 29 Lagen Filtermaterial sind auf Vorfilter, Hauptfilter und Nachfilter aufgeteilt. Vor- und Nachfilter bestehen aus Polyethylentherephthalat, der Hauptfilter aus Polypropylen. Das Filtersystem ist in eine Außenhülle aus PVC eingebettet.

Das Prinzip der Tiefenfiltration ist sehr komplex, lässt sich aber vereinfacht als ein Blockieren, Brückenbilden, Abfangen und Anhaften der Leukozyten an und in dem Filtermaterial beschreiben. Die Oberfläche der Filter ist durch die Schichtung stark vergrößert (68).

3.6. Die Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde unter standardisierten Bedingungen (70, 120) in der Blutspende-einrichtung des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Nach Stauung am Oberarm und Desinfektion der Einstichstelle wurde eine Vena cubitalis mit einer Spendekanüle punktiert. Anschließend wurde die Stauung aufgehoben und die Spende eingeleitet. Es wurden ca. 450 ml Blut

gewonnen. Dem endgültigen Konservenvolumen war die adäquate Menge Antikoagulanzen (63 ml) hinzuzugaddieren. Für die ABC-Gruppe erfolgte die Blutentnahme mittels der ABC[®]-Waage, für die konventionelle Gruppe mithilfe des Compomixer M2[®]. Die sterile Versiegelung der Vollblutkonserve wurde über das Setzen einer Schweißnaht in die Blutentnahmeleitung gewährleistet (Composeal Handschweißgerät, NPBI International B.V., Emmer Compascuum, Niederlande). Bei allen Blutkonserven folgte ein „Stripping“ der Schläuche. Unter dem „Stripping“ versteht man ein Ausstreichen des Blutes aus den Verbindungsschläuchen in die Blutkonserve, sodass das gesamte gesammelte Vollblut in den Sammelbeutel verbracht wird und sich dort mit der vorgelegten Antikoagulanzenlösung vermischt (letzteres ist wichtig für die konventionelle Blutsammlung). Vor der Leukozytenfilterung wurden die Blutkonserven für zwei Stunden auf + 4° C kalten Kühlplatten gelagert (Compocool[®], Fresenius HemoCare).

3.7. Die Aufbereitung der Blutproben

Die Blutkonserven wurden über den Untersuchungszeitraum von 49 Tagen bei + 2° C bis + 6° C gekühlt gelagert (Tyler Refrigeration, Niles, MI, USA). An den Messtagen 1, 7, 21, 35, 42 und 49 wurden die Blutkonserven nach der Entnahme aus dem Lagerungskühlschrank zunächst für fünf Minuten in einen Überkopfröhrator eingespannt. Dadurch vermischten sich die lagerungsbedingt sedimentierten Blutbestandteile.

Für die durchzuführenden Bestimmungen wurde an den entsprechenden Messtagen jeweils ein Gesamtprobevolumen von 40 ml benötigt. Dieses Probevolumen wurde den Vollblutkonserven entnommen, indem unter sterilen Bedingungen ein Kinderbeutel (150 ml „transfusion-bag“, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) an die Konserve angeschweißt wurde (Composeal Schweißgerät, NPBI International B.V.). Nach erfolgter Überleitung der 40 ml Probevolumen in den Kinderbeutel wurde sowohl die Vollblutkonserve als auch der Kinderbeutel über Setzen einer Schweißnaht wieder steril versiegelt. Die Konserven wurden umgehend zurück in den Lagerungskühlschrank verbracht. Der Inhalt des Kinderbeutels wurde auf die einzelnen Untersuchungen verteilt.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Pipettierungen in dieser Studie mit Eppendorf Reference Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) ausgeführt.

3.8. Die Untersuchungen

3.8.1. Leukozytenzählung

Um die Effektivität der Leukozytenfilter zu prüfen, wurde nach der Leukozytendepletion am ersten Untersuchungstag einmalig eine Leukozytenzählung am Durchflusszytometer (FACSCalibur™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mittels des BD Leucocount™-Kits (Becton Dickinson GmbH) durchgeführt (44).

Prinzip der Methode:

Das BD Leucocount™-Reagenz enthält Propidiumjodid (PI). PI ist ein Nukleinsäurefarbstoff, der bei Verwendung zusammen mit RNase selektiv DNA färbt. Im Gegensatz zu Leukozyten, die DNA enthalten und somit gefärbt werden, bleibt bei den nicht kernhaltigen Erythrozyten und Thrombozyten eine Färbung aus.

Als interne Referenz für die genaue Bestimmung der absoluten Anzahl der Restleukozyten dienen Fluoreszenz-Glasperlen, sogenannte Beads, welche im BD Trucount™-Röhrchen vorgelegt sind. Diese werden zusammen mit der Probe im Durchflusszytometer gemessen. Die absolute Restleukozytenzahl ergibt sich aus dem Verhältnis von detektierten Leukozyten zu detektierten Beads (44).

Die Inhalte des BD Leucocount™-Kit-Reagenz sind der Tabelle 2, die der BD Trucount™-Röhrchen der Tabelle 3 zu entnehmen (44).

BD Leucocount™-Kit

Substanz:	Aufgabe:
Propidiumjodid (PI)	färbt spezifisch Nukleinsäuren
0,1 % Natriumazid	Konservierungsmittel und Bakterizid
RNase	für den enzymatischen Abbau der RNA
Detergenzlösung	macht die Zellmembran für PI durchlässig
Verschiedene Puffer	für die Stabilisierung der gefärbten Probe

Tabelle 2: Reagenzien-Inhalte des BD Leucocount™-Kit (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) (44).

BD Trucount™-Röhrchen

Substanz:	Aufgabe:
Lyophilisiertes Pallet aus 4,2-µm-Fluoreszenz-Beads	Interner Standard für die Berechnung der absoluten Anzahl

Tabelle 3: Beschreibung des BD Trucount™-Röhrchens (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) (44).

Prinzip der Durchflusszytometrie:

Bei der Durchflusszytometrie am FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) passieren fluoreszierend markierte Zellen in einer Suspension einen Laserstrahl. Die dadurch erzeugten Streulichtemissionen werden von optischen Detektoren erfasst. Die Menge des gestreuten Lichtes korreliert mit der Größe und der Komplexität der Zelle (43, 290, 381).

Testdurchführung:

Vor Testbeginn wurden die gekühlt gelagerten BD Trucount™-Röhrchen in ihrer luftdichten Verpackung auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Testdurchführung erfolgte wie in nachstehenden Schritten beschrieben:

- Schritt 1: Vorlegung von 100 µl Probe und Kontrolle (BD Leucocount™ RBC Control) in entsprechend beschriftete BD Trucount™-Röhrchen.
- Schritt 2: Zugabe von 400 µl BD Leucocount™-Reagenz in jedes Röhrchen.
- Schritt 3: Verschließen der Röhrchen und vorsichtiges Mischen auf dem Vortex-Mischer.
- Schritt 4: Anschließende Inkubation im Dunkeln für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Bis zur Messung verblieben die Proben an einem dunklen Ort.

Darauf erfolgte die Probenerfassung am Durchflusszytometer. Mittels der CellQuest™ Software wurde die Datenerfassung durchgeführt. Auf einem Punktwolkendiagramm wurden hierzu die Regionen R1 für die BD Trucount™-Beads und R2 für die Restleukozyten definiert. Die Erfassung wurde beendet, wenn in R1 10.000 Ereignisse angefallen waren. Zur Überprüfung von Genauigkeit und Präzision der Messergebnisse dienten Kontrollen. Diese bestanden aus Erythrozyten von Säugetieren und menschlichen Leukozyten in einer mit Konservierungsmittel gemischten plasmaähnlichen Flüssigkeit (44).

Berechnung der absoluten Anzahl von Restleukozyten:

Die Anzahl der Restleukozyten errechnete sich über die Division der Anzahl der Leukozytenereignisse durch die Anzahl der erfassten Fluoreszenz-Beadereignisse sowie Multiplikation des Ergebnisses mit der Bead-Konzentration. Die Restleukozytenanzahl wird pro µl angegeben (44):

$$\text{Restleukozyten} = \frac{\text{Leukozytenergebnisse (R2)}}{\text{Beadereignisse (R1)}} \times \frac{\text{Bead - Zahl pro Röhrchen}^*}{\text{Bead - Volumen der gefärbten Probe [\mu l]}}$$

* Die chargenspezifische Partikelanzahl der BD Trucount™-Röhrchen.

Der Restleukozytengehalt der einzelnen Konserven wurde errechnet durch Multiplikation der Restleukozyten pro μl mit dem Konservenvolumen (44).

3.8.2. pH-Wert

Bei der pH-Wert-Bestimmung ist die Messgröße das Potential der Glaselektrode im Verhältnis zur Bezugselektrode, die ein konstantes Potential aufweist (111). Zur Bestimmung wurde ein Digital-pH-Meter der Firma Knick (Berlin, Deutschland) verwendet.

Testdurchführung:

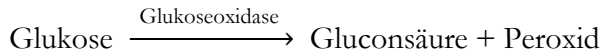
Ungefähr eine Stunde vor Untersuchungsbeginn wurde das Digital-pH-Meter eingeschaltet. Zur Kalibrierung der Elektroden diente Phosphatpuffer mit einem pH von 6,88. Dieser pH-Wert lag in der Nähe des zu bestimmenden pH-Wertes der Blutproben. Der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes wurde dadurch Rechnung getragen, dass sowohl die Eichlösung als auch die Probe Raumtemperatur aufwiesen. Nach jeder Messung wurde eine sorgfältige Reinigung der Glaselektrode mit destilliertem Wasser durchgeführt. Außerhalb der Messungen wurden die Elektroden in einer Elektrodenaufbewahrungslösung bei einem pH von 4,0 gelagert.

3.8.3. Glukose

Prinzip der Methode:

Die an dem klinischen Analysegerät Synchron LX®20 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) durchgeführten Glukosemessungen lassen sich wie folgt beschreiben:

Die Glukosekonzentration wird mittels einer kinetischen Sauerstoffmethode unter Verwendung einer Sauerstoffelektrode bestimmt. In der ersten Reaktion katalysiert das Enzym Glukoseoxidase die Oxidation von Glukose zu Glukonsäure und Peroxid.



Elektronische Schaltkreise bestimmen den Sauerstoffverbrauch, der zur Glukosekonzentration in der Probe direkt proportional ist. In den zwei nachfolgenden Reaktionen wird Peroxid vollständig zerstört, ohne dass Sauerstoff dabei zusätzlich gebildet wird (42).

3.8.4. Laktat

Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte an einem Radiometer ABL™ 700 (Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark).

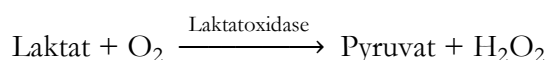
Prinzip der Methode:

Die Laktatbestimmung am ABL™ 700 beruht auf der amperometrischen Methode, d. h. Grundlage der Messung ist eine Elektrodenkette, die sich aus Laktat-Sensoreinheit, beim ABL™ 700 auch als Laktat-Elektrode bezeichnet, Amperemeter und der zu untersuchenden Probe zusammensetzt. Die Laktat-Elektrode besteht aus einer Silberkathode und einer Platinanode und ist von einem mit Elektrolytlösung gefüllten Elektrodenmantel sowie einer Multischichtmembran an ihrer Spitze geschützt (289).

Die Multischicht-Membran setzt sich aus drei Schichten zusammen:

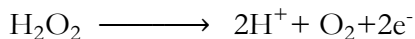
1. äußere Membranschicht (für Laktat durchlässig),
2. mittlere Enzymschicht,
3. innere Membranschicht (für H₂O₂ durchlässig).

Durch Anlegen einer Polarisierungsspannung von 675 mV an die Elektrodenkette werden Laktat-Moleküle über die äußere Membran transportiert. Die sich zwischen der inneren und äußeren Membranschicht befindende Laktat-Oxidase wandelt darauf Laktat gemäß folgender Reaktion um (289):



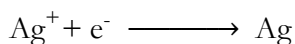
Das für diese Reaktion benötigte O₂ kommt sowohl von der äußeren Membranschicht als auch durch die H₂O₂-Oxidation an der Platin-Anode. Das durch die Reaktion entstandene

H₂O₂ wird über die innere Membran zur Platin-Anode transportiert. Aufgrund der an der Elektrodenkette angelegten Spannung wird H₂O₂ an der Platin-Anode oxidiert und es werden Elektronen freigesetzt (289, 346):



Der so freigesetzte Elektronenfluss wird am Amperemeter detektiert. Die Größe dieses Stroms ist der H₂O₂-Menge und demnach auch der ursprünglichen Laktatmenge proportional.

Zur Vervollständigung des elektrischen Stromkreises erfolgt zum Verbrauch der Elektronen eine Reduktionsreaktion an der Kathode. Dabei wird Ag⁺ (aus AgCl) in Ag-Metall umgewandelt (289):



Durchführung:

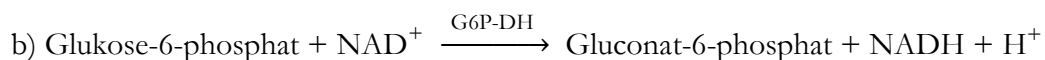
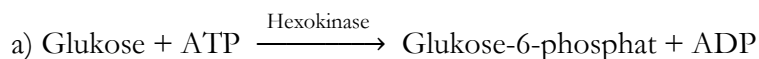
2 ml Probenblut wurden in eine Blutgasanalysespritze verbracht (PICO50, Radiometer Copenhagen, Dänemark; mit genormter Spitze für die Einlassöffnung des Radiometers ABL™ 700). Die in besagter Spritze zur Antikoagulation vorgelegten ca. 80 IU von elektrolytkompensiertem Lithium/Natrium-Trocken-Heparin hatten auf die Bestimmungen keinen Einfluss. Es wurde darauf geachtet, dass die Blutprobe bis zur Messung luftdicht gehalten wurde.

3.8.5. ATP

Zur Messung des ATP-Gehaltes der Blutproben diente die etablierte und spezifische Bestimmungsmethode mit Hexokinase und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Rolf Greiner BioChemica, Flacht, Deutschland).

Prinzip der Methode:

Hexokinase phosphoryliert Glukose mit ATP in Anwesenheit von Mg²⁺ zu Glucose-6-phosphat. Im nächsten Schritt katalysiert Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) die Dehydrierung von Glucose-6-phosphat mit NAD zu Gluconat-6-phosphat.



NADH ist die Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 334 nm, 340 nm und 365 nm am Photometer bestimmbar. Pro Mol ATP entsteht ein Mol NADH (210, 304, 350).

Testdurchführung:

Zur Testvorbereitung war primär die Enteiweißung (Deproteinierung) der Proben erforderlich (164, 210). Dies erfolgte in gleichem Verhältnis zur eingesetzten Probe (1 ml) mit 12-prozentiger Trichloressigsäure in einem Zentrifugenröhrchen. Nach Aufbewahrung in einem Eisbad für fünf Minuten wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (Varifuge K, Heraeus Christ, Hanau). 250 µl des klaren Überstandes wurden unmittelbar nach der Zentrifugation zum Test angesetzt und hieraus eine Probe, ein Standard und ein Leerwert hergestellt. Das Zusammenfügen der Substanzen erfolgte, wie unten beschrieben, in einer Glasküvette von 1 cm Schichtdicke. Die Zusammensetzung der Reagenzien R1 und R2 sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 340 nm gegen den Leerwert (Wasser) am Photometer (Spectrophotometer Uvicon 810, Kontron Instruments, Everett, MA, USA) (304).

	Leerwert	Probe	Standard
Probe/Standard	-	250 µl	250 µl
Aqua bidest.	250 µl	-	-
R1	2400 µl	2400 µl	2400 µl

Die Substanzen wurden in der Glasküvette durchmischt und bei Raumtemperatur (+ 22° C bis + 25° C) inkubiert. Nach fünf Minuten konnten die Extinktion E1 von Leerwert, Probe und Standard abgelesen werden. Im nächsten Schritt folgte unter Vermischung die Zugabe von jeweils 600 µl **R2** in die Glasküvetten. Bei Raumtemperatur wurde für weitere 15 Minuten inkubiert. Mit Terminierung der Reaktion innerhalb von 30 Minuten wurde die Extinktion E2 bestimmt (304).

Reagenz	Inhalt	pH	Konzentration
R1:	TRIS-Puffer	pH 7,8	0,1 mol/l
	Mg ²⁺		4,0 mmol/l
	Glukose		20,0 mmol/l
	NAD		2,1 mmol/l
R2:	Mg ²⁺	pH 7,0	4,1 mmol/l
	Hexokinase		≥ 7,5 kU/l
	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase		≥ 7,5 kU/l

Tabelle 4: Reagenzien des Testkits ATP Hexokinase (Rolf Greiner BioChemica, Flacht, Deutschland) (304).

Berechnung der ATP Konzentration:

Anhand des Lambert-Beerschen-Gesetzes ließ sich die ATP-Konzentrationen mit folgender Formel ermitteln (304):

$$c = \frac{V \times F \times 100}{\epsilon \times v \times d} \times \Delta E \text{ } [\mu\text{mol/dl}]$$

wobei:

$$V = \text{Gesamtvolumen der Küvette } [\mu\text{l}] = 3250,0$$

$$F = \text{Verdünnungsfaktor durch Probenverdünnung} = 2,0$$

$$d = \text{Schichtdicke der Küvette } [\text{cm}] = 1,0$$

$$v = \text{Probevolumen } [\mu\text{l}] = 250,0$$

$$\epsilon = \text{Ext.koeffizient NADH } [1 \times \text{cm}^{-1} \times \text{mmol}^{-1}] = 6,3$$

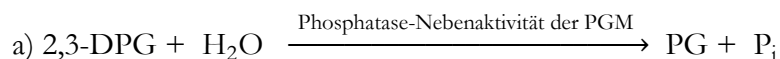
$$\Delta E = \text{Extinktionsänderung} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe / Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

3.8.6. 2,3-DPG

Die Bestimmung von 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) erfolgte mittels einer stöchiometrisch-enzymatischen Messmethode. Das dabei entstehende NADH ist die Messgröße, aus deren Konzentrationszunahme photometrisch die 2,3-DPG-Konzentration ermittelt wurde. Hierzu wurde das Testkit der Firma Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet.

Prinzip der Methode:

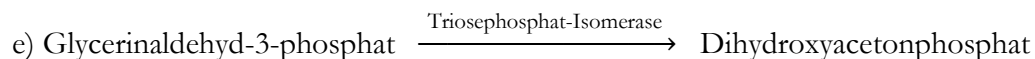
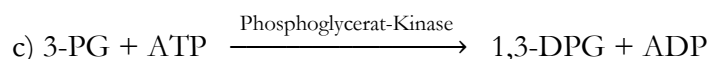
Das durch eine Nebenaktivität der Phosphoglycerat-Mutase (PGM) aus 2,3-DPG gebildete Phosphoglycerat (PG) wird in einer mehrstufigen Reaktion in Glycerin-3-phosphat überführt. 2-Phosphoglycerat agiert hierbei als Aktivator der Nebenaktivität der PGM.



Bei der unter a) beschriebenen Reaktion können sowohl 2-Phosphoglycerat (2-PG) als auch 3-Phosphoglycerat (3-PG) entstehen. Das entstandene 2-Phosphoglycerat wird anschließend durch die PGM in 3-Phosphoglycerat überführt.



Die weiteren Schritte beschreiben die Umsetzung von 3-Phosphoglycerat in Glycerin-3-phosphat.



Die Reaktionen b) bis f) laufen hierbei im Vorwege der Reaktion a) ab. Dieses dient der Entfernung störender Verbindungen wie z. B. 3-Phosphoglycerat, Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton. Die bereits während dieser Vorinkubation vorhandene geringe Menge an PGM entfernt störendes 2-Phosphoglycerat, wie in Reaktion b) beschrieben. Diese Menge an PGM ist jedoch zu gering, um 2,3-DPG durch die Nebenaktivität der PGM zu spalten, sodass mit Verlusten an dieser Verbindung während der Vorinkubation nicht zu rechnen ist. Erst nach Abschluss der Vorinkubation wird eine hinreichende Menge an PGM zusammen mit dem Aktivator 2-Phosphoglycerat zugesetzt, woraufhin 2,3-DPG nach Gleichung a) gespalten wird. Pro Mol 2,3-DPG werden 2 Mol NADH oxidiert. Diese Umsetzung kann photometrisch bei 340 nm, 334 nm oder 365 nm gemessen werden (119, 250, 303).

Reagenzien:

Das Testkit umfasste vier Flaschen mit Substratgemischen sowie eine Flasche mit Triethanolaminpuffer. Die Inhalte der Flaschen wurden entweder in Aqua bidest. oder in Triethanolaminpuffer gelöst. Der Inhalt der Flaschen ist in Tabelle 5, die hergestellten Lösungen sind in Tabelle 6 beschrieben.

Flasche	Etikett	Inhalt
1	Triethanolamin-Puffer	48 mM
2	ATP und NADH	ca. 24 mg ATP und ca. 8,2 mg NADH
3	PGM, PGK, GAP-DH, TIM, GDH	Lyophilisat ca.: 25 U PGM 1600 U PGK 25 U GAP-DH 870 U TIM 230 U GDH
4	PGM	Lyophilisat 620 U PGM
5	Glykolat-2-phosphat, Tricyclohexylammoniumsalz	16,4 mg

Tabelle 5: Inhalte der einzelnen Flaschen des 2,3-DPG Testkits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Abkürzungen: PGM = Phosphoglycerat-Mutase; PGK = Phosphoglycerat-Kinase; GAP-DH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; TIM = Triosephosphat-Isomerase; GDH = Glycerin-3-phosphat- Dehydrogenase, U = units, (303).

Testdurchführung:

Die Proben wurden während des gesamten Tests gekühlt. Daher erfolgten Probenlagerung und Untersuchungsdurchführung in einem Eisbad. Da sich der 2,3-DPG-Gehalt der Blutproben sehr schnell verändert, musste innerhalb der ersten Stunde nach Probenentnahme eine Enteiweißung der Proben erfolgen. Das Prinzip der Enteiweißung beruht auf der Versetzung von Probenblut mit 0,6 M Perchlorsäure in einem Verhältnis von 1 : 5. In der gekühlten Zentrifuge wurde dieses Gemisch bei 5000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert (Varifuge K, Heraeus Christ, Hanau, Deutschland). Anschließend wurden 4 ml des klaren und farblosen Überstandes in ein neues Röhrchen pipettiert und die überschüssige Säure mit 0,5 ml 2,5 M Kalium-Carbonat neutralisiert. Nach folgender Inkubation für 60 Minuten im Eisbad wurden der Kalium-Carbonat Niederschlag in der Kälte abzentrifugiert und 0,1 ml des Überstandes zur Analyse eingesetzt (163, 303).

Lösung	Vorbereitung	Inhalt
2	Inhalt der Flasche Nr. 2 in 1 ml Aqua bidest. gelöst.	40 mM ATP 9,6 mM NADH
3	Inhalt der Flasche Nr. 3 in 1,75 ml Triäthanolaminpuffer gelöst.	14×10^3 U/l PGM 94×10^4 U/l PGK 14×10^3 U/l GAP-DH 50×10^4 U/l TIM 13×10^4 U/l GDH
4	Inhalt der Flasche Nr. 4 in 0,7 ml Triäthanolaminpuffer gelöst.	88×10^4 U/l PGM
5	Inhalt der Flasche Nr. 5 in 0,7 ml Aqua bidest. gelöst.	48 mM 2-Phosphoglycerat

Tabelle 6: Reagenzien-Lösungen des 2,3-DPG Testkits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Abkürzungen: PGM = Phosphoglycerat-Mutase; PGK = Phosphoglycerat-Kinase; GAP-DH = Glycerataldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; TIM = Triosephosphat-Isomerase; GDH = Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, U = units, (303).

Zur Testdurchführung wurden Doppelbestimmungen angesetzt. Die Extinktionsmessung des 2,3-DPG-Gehaltes erfolgte am Photometer bei 340 nm gegen den Leerwert (Spectrophotometer Uvicon 810, Kontron Instruments, Everett, MA, USA). Dazu wurden in mehreren Schritten nacheinander folgende Substanzen in eine Glasküvette (1 cm Schichtdicke) pipettiert und gut durchmischt:

Schritt	Lösung	Leerwert	Probe
1	Triäthanolaminpuffer	2,00 ml	2,00 ml
	Lösung 2	0,05 ml	0,05 ml
	Lösung 3	0,05 ml	0,05 ml
	Neutralisierte Probe	-	0,10 ml
	Aqua bidest.	0,10 ml	-
2	Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktionsbestimmung E_1 durchgeführt. Es folgte die Zugabe mit anschließender Durchmischung von:		
3	Lösung 4	0,02 ml	0,02 ml
	Lösung 5	0,02 ml	0,02 ml
4	Das Gesamtvolumen betrug jeweils 2,24 ml. Nach Ende der Reaktion (ca. 25 Minuten) wurde die Extinktion E_2 abgelesen (303).		

Berechnung der 2,3-DPG-Konzentration:

Die Bestimmung der Konzentration des 2,3-Diphosphoglycerates erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes (303):

$$c = \frac{V \times MW \times F}{\epsilon \times d \times v \times 1000 \times 2} \times \Delta E \text{ [g/l Blut]}$$

wobei:

V	=	Gesamtvolumen der Küvette [ml]	=	2,24
v	=	Probenvolumen [ml]	=	0,10
MW	=	Molekulargewicht von 2,3-DPG [g × mol ⁻¹]	=	266,037
d	=	Schichtdicke der Glasküvette [cm]	=	1,00
ε	=	Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm	=	6,3 (l × mmol ⁻¹ × cm ⁻¹)
2	=	Multiplikation mit 2, da pro Mol 2,3-DPG 2 Mol NADH umgesetzt werden		
1000	=	Umrechnungsfaktor: μMol/mg	=	10 ⁻³ Mol/g
ΔE	=	Extinktionsänderung = (E ₁ - E ₂) _{Probe} - (E ₁ - E ₂) _{Leerwert}		
F	=	Verdünnungsfaktor für Blut (81 % Flüssigkeitsgehalt)	=	6,582

F ist laut folgender Formel errechenbar:

$$F = \frac{V_{\text{nach Neutralisation}}}{V_{\text{vor Neutralisation}}} \times \frac{V_{\text{Blut}} \times 0,81 + V_{\text{Perchlorsäure}}}{V_{\text{Blut}}}$$

Daraus ergibt sich für die Konzentration von 2,3-DPG im Blut ein Wert von:

$$c = 11,7 \times \Delta E_{340 \text{ nm}} \text{ [mM/l]} \text{ oder } c = 3,112 \times \Delta E_{340 \text{ nm}} \text{ [g/l]}$$

3.8.7. Hämatokrit und Hämoglobin

Hämatokrit- und Hämoglobinwerte wurden am Zellzähler Sysmex K 1000 (TOA Medical Electronics, Kobe, Japan) ermittelt. Der Sysmex K 1000 ist ein vollautomatisches Hämatologie-Analysegerät für die quantitative *in vitro* Diagnostik.

Prinzip der Hämatokrit-Messung:

Die Zellzählung am Sysmex K 1000 erfolgt nach dem elektronischen Widerstandsmessprinzip. Beim Passieren einer engen Öffnung, durch die ein schwacher Gleichstrom von der inneren zur äußeren Elektrode fließt, erzeugen die Blutzellen mittels Verdrängen einer Verdünnungslösung Widerstandsänderungen bzw. Spannungsimpulse. Diese so

erzeugten Spannungsimpulse sind dem Volumen der Blutzellen proportional. Der Hkt-Wert errechnet sich aus allen gemessenen Einzelimpulsen. Die Summierung der Einzelimpulse wird als kumulative Impulshöhensummierung bezeichnet (342).

Um das Verdünnungsverhältnis zu berücksichtigen, erfolgte die Multiplikation des Ergebnisses mit einem konstanten Faktor. Der Hämatokrit stellt den Volumenanteil aller Erythrozyten am Volumen der Blutprobe dar und wird in Prozent angegeben (342):

$$\text{Hkt} = \frac{V_{\text{= Volumen aller Erythrozyten in der Probe}}}{V_{\text{I = Gesamtvolumen der Probe}}} \times 100 [\%]$$

Prinzip der Hämoglobin-Messung:

Zur Bestimmung von Hämoglobin (Hb) wurden 12 µl Probenblut mit 2 ml Verdünnungslösung und 1 ml Hb-Hämolysemittel (Sysmex Stromatolyser-C) vom K 1000 automatisch im Verhältnis 1 : 500 verdünnt. Die dadurch erfolgte Hämolyse der Erythrozyten führte zur Freisetzung von Hämoglobin in die Verdünnungslösung. Nach dem Prinzip der Hämiglobincyanid-Methode bildet sich ein Hämiglobincyanidkomplex, dessen Konzentration am integrierten Photometer des K 1000 bei einer Extinktion von 545 nm gemessen wird (342). Die Hämiglobincyanid-Methode ist in der Methodik zur Bestimmung des freien Hämoglobins im Abschnitt „Freies Hämoglobin und Hämolyserate“ beschrieben. Eine hohe Leukozytenkonzentration kann durch Absorption des Lichtes an den Zellen das Hb-Messergebnis fälschlich erhöhen. Leukozytendepletion und Hb-Hämolysemittel minimieren diesen Einfluss.

Zur Ermittlung des Hb-Wertes in g/l wurde die Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Leerwert errechnet (342):

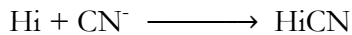
$$\text{Hb [g/l]} = \text{Probe}_{\text{E545}} - \text{Leerwert}_{\text{E545}}$$

3.8.8. Freies Hämoglobin und Hämolyserate

Die Bestimmung des freien Hämoglobin (fHb) erfolgte photometrisch mit der Hämiglobincyanid-Methode (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Hämoglobin Ecoline®).

Prinzip der Hämiglobincyanid-Methode:

Hämoglobin und Hämoglobinderivate (mit Ausnahme von Verdoglobin) werden durch eine Reaktionslösung quantitativ in Hämiglobincyanid überführt. Kaliumhexacyanoferrat oxidiert zunächst das zweiwertige Eisen des Hämoglobins zu dreiwertigem Eisen. Das so entstandene Hämoglobin (Hi) bildet mit Cyanidionen (CN⁻), welche von Kaliumcyanid bereitgestellt werden, einen stabilen roten Hämiglobincyanidkomplex (HiCN).



HiCN hat ein breites Absorptionsmaximum bei 540 nm. Die Absorption von HiCN ist bei 540 nm proportional zur Hb-Konzentration (52, 346).

Testdurchführung:

Bei dem in Doppelbestimmungen durchgeführten Test wurden in eine Halbmikroküvette 250 µl Probeplasma mit 1000 µl Reaktionslösung zusammengefügt und gründlich durchmischt. Die Reaktionslösung bestand aus Kaliumhexacyanoferratlösung und Kaliumcyanidlösung. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten waren die Extinktionen der Probe gegen den Leerwert bei 540 nm und 680 nm messbar. Mitlaufende Kontrollen dienten der Validierung der Ergebnisse (201).

Berechnung der freien Hämoglobinkonzentration und der Hämolyserate:

Die Extinktion der Probe bei 680 nm wurde von der Extinktion der Probe bei 540 nm subtrahiert und anschließend mit dem Faktor 7460 multipliziert. Der fHb-Wert wird in mg/l angegeben (201):

$$\text{fHb [mg/l]} = (E_{540} - E_{680}) \times 7460$$

Die Hämolyserate ist mithilfe folgender Formel kalkulierbar (201):

$$\text{Hämolyserate [\%]} = \frac{100 - \text{Hk [\%]}}{\text{Gesamt-Hb [g/l]}} \times \text{fHb [mg/l]} \times 0,001$$

Eine Umrechnung der fHb-Konzentration auf die Konserven ist wie nachstehend beschrieben möglich (201):

$$\text{Volumen der Konserve [in l]} \times \text{Plasmavolumen} \times \text{fHb [g/l]}$$

3.8.9. Kalium

Die flammenphotometrischen Kaliumbestimmungen erfolgten am AFM 5051 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Prinzip der Methode:

Bei der Flammenphotometrie wird die emittierte Lichtemission gemessen, wenn Erdalkali- und Alkali-Atome in einer Flamme angeregt werden. Dabei ist die Lichtintensität direkt proportional der Anzahl der Atome, welche wiederum direkt proportional zu der Anzahl der entsprechenden Ionen in der Probe sind.

Die in Wasser gelöste Messsubstanz wird über einen Zerstäuber fein verteilt als Aerosol in eine nicht leuchtende Flamme gebracht, was zu einem Aufleuchten der Flamme führt. Jedes Element hat, bedingt durch den Aufbau seines Atoms, eine charakteristische Lichtfarbe, d. h. es strahlt bestimmte, genau festgelegte Wellenlängen aus. Mithilfe optischer Filter wird das Licht des zu messenden Elementes isoliert und auf eine Photodiode weitergeleitet, die das Licht in ein elektrisches Signal umwandelt. Das Signal wird verstärkt, digitalisiert, und ein nachgeschalteter Rechner kalkuliert die Konzentration. Das AFM 5051 arbeitet nach dem Leitlinienprinzip. Nach dem Leitlinienprinzip wird die Kaliumprobe mit einer Verdünnungslösung 1 : 50 verdünnt, die Lithium als Leitelement enthält. Alle Veränderungen wirken sich nicht nur auf das Messelement, sondern auch auf das Leitelement Lithium annähernd gleich aus. Lithium dient als interner Standard. Bei dem Standard-Abgleich erfolgt die Bestimmung der Lithium-Konzentration und wird auf „1“ gesetzt. Aus jeder Lithium-Änderung wird ein Korrekturfaktor errechnet. Um diesen Korrekturfaktor werden die Messwerte der jeweiligen Probe korrigiert (118, 347).

3.9. Gerinnung

Die im Folgenden beschriebenen Gerinnungsanalysen wurden am BCS[®]XP-System (Dade Behring, Marburg, Deutschland) durchgeführt. Die Bestimmung der Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT) erfolgte mittels ELISA-Test.

Das BCS[®]XP-System ist ein vollautomatischer Gerinnungsanalysator zur Abarbeitung koagulometrischer, chromogener und immunochemischer Tests. Kurz zusammengefasst besteht das BCS[®]XP-System aus dem **Analyzer**, der Proben und Reagenzien via Barcode einliest, diese pipettiert, Verdünnungen für Proben und Kalibratoren ansetzt, inkubiert und die Testansätze misst und dem **Rechner**, der die Verwaltungs- und Arbeitsabläufe steuert, die Referenzkurven und Testresultate berechnet, letztere speichert und mit der Labor-EDV kommunizieren kann (93).

Es wurden aus Plasma bestimmt: Thrombinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Thromboplastinzeit nach Quick, Faktor-V-Aktivität, Faktor-VIII-Aktivität, Antithrombin-Aktivität, Fibrinogen, D-Dimere und Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT). Die interne Qualitätskontrolle bei sämtlichen Untersuchungen am BCS[®]XP-System erfolgte mit Kontrollplasmen. Standard-Human-Plasma diente der Erstellung von Bezugskurven, aus welchen die entsprechenden Konzentrationen der untersuchten Parameter abgeleitet wurden. Die Zusammensetzung der Reagenzien lässt sich aus den Tabellen 7 und 8 auf den Seiten 78 und 79 entnehmen.

3.9.1. Gerinnungszeiten

Gerinnungszeitanalysen dienen als globale Tests zur Erkennung von Störungen oder Mangelzuständen im Gerinnungssystem.

Über die Bestimmung der **Thrombinzeit (TT)** lassen sich Unregelmäßigkeiten in der Fibrinbildung der Gerinnungskaskade erfassen. Verminderung von Fibrinogen, Störungen der Fibrinogenpolymerisation und Antikoagulation mit Heparin führen zu einer Verlängerung der Thrombinzeit. Bei der mit der BC-Thrombin-Reagenz (Dade Behring, Marburg, Deutschland) durchgeführten Thrombinzeitbestimmung wandelt Thrombin das in der Plasmaprobe enthaltene Fibrinogen in Fibrin um, wodurch ein Gerinnsel entsteht. Es wurde die Zeit bis zur Gerinnselbildung gemessen. Die Thrombinzeit wird in Sekunden angegeben (92).

Zur Aufdeckung von Störungen des endogenen Gerinnungssystems mit Verminderung der Faktoren VIII, IX, XI und XII eignet sich die Ermittlung der **aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT)** (22). Zur Bestimmung wurde das Pathrombin® SL Testkit (Dade Behring) eingesetzt (99).

Prinzip der Methode:

Die Inkubation der Plasmaprobe mit Phospholipiden und der als Oberflächenaktivator eingesetzten Siliciumdioxid-Partikel führt zur Aktivierung von Faktoren des endogenen Gerinnungssystems. Mittels Zugabe von Calcium-Ionen wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Es wird die Zeit bis zur Fibringerinnungsbildung bestimmt. Die aPTT wird in Sekunden angegeben (99).

Durchführung:

Bei + 37° C wurden 100 µl des verdünnten Probenplasmas und 100 µl Pathrombin® SL Reagenz zusammengefügt und für zwei Minuten inkubiert. Mit Zugabe von 100 µl Calciumchlorid-Lösung erfolgte die Bestimmung der Gerinnungszeit (99).

Die Bestimmung der **Thromboplastinzeit (PT)** erfolgte nach der Methode von Quick (100). Der Thromborel® S Test (Dade Behring) ist ein empfindlicher Screening-Test auf Gerinnungsstörungen im Bereich des exogenen Gerinnungssystems mit den Faktoren II, V, VII und X sowie Fibrinogen. Durch die Inkubation von Probenplasma mit der optimalen Menge an Thromboplastin und Calcium wurde der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Mit Zugabe des Reagenz zu dem Probenplasma wurde die Zeit bis zur Bildung des Fibringerinnsels gemessen. Die ermittelte Thromboplastinzeit nach Quick wird in % der Norm angegeben. Ebenfalls diente der Thromborel® S Test zur Bestimmung der Fibrinogen-Konzentration (100, 320).

3.9.2. Faktor-V-Aktivität

Die beiden Faktoren V und VIII stehen aufgrund ihrer Labilität und kurzen Halbwertszeit stellvertretend als Qualitätsparameter von Gerinnungsfaktoren in therapeutischem Plasma (fresh-frozen-plasma, FFP) (120). Bei der Bestimmung der Faktor-V-Aktivität mit dem Gerinnungsfaktor-V-Mangelplasma-Testkit (Koagulometrischer Test; Dade Behring) führt

die Inkubation von Faktor-V-Mangelplasma mit verdünntem Probenplasma und einem Thromboplastin zur Aktivierung der Faktoren des exogenen Gerinnungssystems. Als Cofaktor der Protease Faktor Xa beschleunigt die Anwesenheit von Faktor V die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin durch den Faktor Xa um ein Vielfaches. Es wurde die Zeit von der Zugabe des Thromboplastins bis zur Bildung eines Fibringerinnsels gemessen (22, 98).

Durchführung:

Die Plasmaprobe wurde im Verhältnis 1 : 20 in Imidazol-Pufferlösung verdünnt. 100 µl dieser verdünnten Plasmaprobe wurden mit 100 µl Mangelplasma vermischt. Nach exakt 60 Sekunden Inkubationszeit bei + 37° C erfolgte das Hinzufügen von 200 µl Prothrombin-Reagenz (Thromborel® S). Mit Zugabe des Prothrombin-Reagenz begann die Messung der Gerinnungszeit. Anhand der Bezugskurve wurde der Gehalt an Faktor V in % der Norm angegeben (98).

3.9.3. Faktor-VIII-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung von Faktor VIII erfolgte mittels eines chromogenen Testes (Faktor VIII Chromogen; Dade Behring). Das Prinzip der Bestimmung beruht darauf, dass zunächst Faktor VIII durch Thrombin aktiviert wird. Faktor VIIIa beschleunigt darauf die Umwandlung von Faktor X zu Faktor Xa. Dieses erfolgt in Gegenwart von aktiviertem Faktor IX, Phospholipiden und Calciumionen. Die Faktor-Xa-Aktivität wird durch die Hydrolyse eines Faktor Xa-spezifischen p-Nitroanilid-Substrates (CH₃OCO-D-CHG-Gly-Arg-p-Nitroanilid) bestimmt. Die Ausgangsmenge des freigesetzten p-Nitroanilin, photometrisch bei 405 nm ermittelt, ist proportional zur Faktor-Xa-Aktivität und folglich proportional zur Faktor-VIII-Aktivität der Probe. Nachstehend ist der Reaktionsablauf beschrieben (97):

a) Faktor VIII + Thrombin \longrightarrow Faktor VIIIa

b) Faktor X $\xrightarrow{\text{F VIIIa, F IXa, Phospholipide, Ca}^{2+}}$ Faktor Xa

c) CH₃OCO-D-CHG-Gly-Arg-p-Nitroanilid



Testdurchführung:

Probe und Kalibrierplasma wurden zunächst mit Faktor-X-Reagenz und Faktor-IXa-Reagenz zu jeweils 0,1 ml vermischt und für 90 Sekunden bei + 37° C inkubiert. Nach Zusatz von je 0,5 ml Substrat-Reagenz und Stopp-Puffer erfolgte die Extinktionsbestimmung bei 405 nm. Über eine mit Kalibrierplasma hergestellte Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt. Die Aktivität des Faktors VIII, angegeben in % der Norm, wurde anhand dieser Standardkurve verifiziert (97).

3.9.4. Fibrinogen (PT-derived)

Die Fibrinogenbestimmung erfolgte durch Messung der Absorptionszunahme im Ansatz der Thromboplastinzeit-Bestimmung (345). Hierfür wurde der Thromborel® S Test (Dade Behring) verwendet.

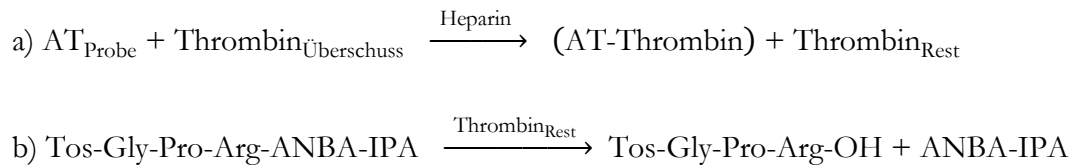
Mit dem BCS®XP-System konnte die Fibrinogenkonzentration durch Analyse der Veränderung im optischen Signal während der Thromboplastinzeit-Bestimmung anhand einer chargenabhängigen Kalibrationskurve abgeleitet werden (320).

3.9.5. Antithrombin

Antithrombin (AT) ist der plasmatische Inhibitor von Thrombin und aktiviertem Faktor X und bildet mit diesen Enzymen irreversibel einen inaktiven Komplex. Die Inaktivierung der aktivierten Gerinnungsfaktoren durch Antithrombin kann mit Heparin massiv beschleunigt werden (22, 94). Die quantitative Bestimmung der funktionellen Aktivität von Antithrombin im Plasma erfolgte mit dem Berichrom®-Antithrombin-Testkit (Dade Behring) (94).

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass das Antithrombin der Probe durch Heparin in einen Sofort-Inhibitor überführt wird und das vorgelegte Thrombin inaktiviert. Der Rest-Thrombin-Gehalt wird unter Zufügung von Substrat-Reagenz (Tos-Gly-Pro-Arg-

ANBA-IPA, siehe Tab. 7) in einem kinetischen Test mit Extinktionszunahme bei 405 nm nach folgendem Reaktionsschema bestimmt:



Die Extinktion nimmt linear mit dem in der Plasmaprobe vorliegenden Antithrombin ab (94).

Testdurchführung:

1 µl Plasmaprobe und 60 µl Thrombin-Reagenz wurden vermischt und für drei Minuten bei + 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Substrat-Reagenz erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 405 nm. Die funktionelle Aktivität von Antithrombin wurde in % der Norm beschrieben (94).

3.9.6. D-Dimere

Zur Stabilisierung von Fibringerinnseln erfolgt unter Vermittlung von Faktor XIIIa die Ausbildung quervernetzter Strukturen unter den Fibrinmolekülen. Werden diese Quervernetzungen durch Plasmin gespalten, entsteht als terminales Abbauprodukt ein Fibrinfragment. Dieses Fibrinfragment besteht aus kovalent verbundenen D-Domänen. Die kleinste Einheit ist das D-Dimer. Erhöhte D-Dimer-Konzentrationen gelten als Indikator für eine reaktive Fibrinolyse und lassen auf eine Gerinnungsaktivierung oder das Vorhandensein von Thromben schließen. Die Untersuchung erfolgte mit dem D-Dimer PLUS Testkit (Dade Behring). D-Dimer PLUS ist ein latexverstärkter, immun-turbidimetrischer Test zur quantitativen Bestimmung quervernetzter Fibrinspaltprodukte (D-Dimere) im menschlichen Plasma (95).

Prinzip der Methode:

Unter der Turbidimetrie versteht man ein Verfahren der Photometrie zur quantitativen Bestimmung des Feststoffanteils (Trübung) von Suspensionen. Das D-Dimer-PLUS-Reagenz enthält Polystyrolpartikel, an die kovalent ein monoklonaler Antikörper (DD5) gegen die Quervernetzungsregion quervernetzter Fibrinspaltprodukte (D-Dimer) gebunden

ist. Sobald die Polystyrolpartikel mit D-Dimer enthaltenden Proben gemischt werden, kommt es zur Agglutination. Die sich bildenden Immunkomplexe führen zu einer Trübungszunahme, welche turbidimetrisch detektiert werden kann. Die Kalibrierung erfolgte über eine Verdünnungsreihe mit D-Dimer-PLUS-Standard-Plasma (Dade Behring). Die Konzentration in $\mu\text{g/l}$ wurde anhand einer Referenzkurve ermittelt (95).

3.9.7. Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT-Komplexe)

Thrombin liegt im Blut fast ausschließlich an Antithrombin gebunden vor, und zwar in einem 1:1 Komplex. Die quantitative Bestimmung des Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT) spiegelt das Ausmaß thrombinspezifischer Gerinnungsprozesse wider und ist damit ein Aktivierungsmarker der Gerinnung. Der bei der Hemmung von Thrombin durch Antithrombin (AT) gebildete inaktive Proteinase-Inhibitor-Komplex lässt sich quantitativ durch einen Enzymimmunoassay erfassen (22). Es wurde das Enzygnost[®] TAT micro Testkit (Dade Behring) verwendet (96).

Prinzip der Methode:

Der Enzygnost[®] TAT micro ist ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) und arbeitet nach dem Sandwich-Prinzip. Während der ersten Inkubation bindet sich der in der Probe vorhandene TAT an die Antikörper gegen Thrombin, die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nachdem überschüssiges Proben- und Puffermaterial ausgewaschen ist, folgt in einer zweiten Reaktion die Bindung von Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen Human-AT an die freien AT-Determinanten. Überschüssige Enzym-konjugierte Antikörper werden in einem erneuten Auswaschvorgang entfernt. Nach Unterbrechung der enzymatischen Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure erfolgt abschließend die photometrische Bestimmung der TAT-Konzentration (96).

Testdurchführung:

Der Test wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Referenz diente ein Standard. Die Enzygnost[®] TAT micro Testplatte besteht aus mehreren Vertiefungen. Zunächst wurden in jede dieser Vertiefungen 50 μl Probenpuffer TAT vorgelegt. Danach wurden je 50 μl Standard, Kontrolle oder Probe hinzu pipettiert. Kurzes Schütteln der Testplatte gewährleistete ein vollständiges Durchmischen der Substrate. Mit selbstklebender Folie

abgedeckt, wurde die Testplatte für 15 Minuten bei + 37° C inkubiert. Nach Abziehen der Folie wurden alle Vertiefungen abgesaugt, mit je 0,3 ml verdünnter Waschlösung gewaschen und daraufhin nochmals entleert. Nach zweimaligem Wiederholen des Waschvorgangs wurde die Testplatte auf Zellstoff ausgeklopft, um Reste der Waschlösung zu entfernen. Darauf wurde jede Vertiefung mit 100 µl Konjugatlösung befüllt, die Riegel mit neuer Folie abgedeckt und für 15 Minuten bei + 37° C inkubiert. Nach Entfernen der Folie wurden alle Vertiefungen abermals abgesaugt und, wie oben beschrieben, dreimal gewaschen und ausgeklopft. Im nächsten Schritt wurden die Vertiefungen mit jeweils 100 µl einer frisch angesetzten Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung befüllt. Erneut wurde die Platte mit Folie abgedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 100 µl Stopplösung POD beendet. Innerhalb einer Stunde erfolgte die photometrische Bestimmung bei einer Messwellenlänge von 492 nm (Tecan Sunrise[™], Crailsheim, Deutschland) (96).

Auswertung:

Anhand der Extinktionsmittelwerte der Standards wurde eine Bezugskurve erstellt. Die TAT-Konzentrationen der Proben ließen sich direkt über die Bezugskurve verifizieren. Die Auswertung erfolgte automatisch am Tecan Sunrise[™] Phothometer (Software: Magellan2[™], Tecan, Crailsheim, Deutschland). Die Konzentration ist in µg/l angegeben (96).

Gerinnungstest	Reagenz	Inhalt
Interne Qualitätskontrolle für den Normbereich	Kontroll-Plasma N	Lyophilisiert, aus Mischplasma von ausgewählten gesunden Spendern, Hepes-Pufferlösung (12 g/l)
Interne Qualitätskontrolle für den path. Bereich	Kontroll-Plasma P	Lyophilisiert, aus Mischplasma von ausgewählten gesunden Spendern, definierte Faktorenkonzentration, Hepes-Pufferlösung (12 g/l)
Kalibrierplasma	Standard-Human-Plasma	Lyophilisiert, aus Mischplasma von ausgewählten gesunden Spendern, Hepes-Pufferlösung (12 g/l)
Thrombinzeit	BC-Thrombin-Reagenz	Lyophilisiertes Thrombin und Albumin vom Rind
	Pufferlösung	Hepes-Puffer (25 mmol/l), pH 7,4
	Konservierungsmittel	5-Chlor-2-methyl-isothiazol-3-on (6 mg/l) und 2-Methyl-isothiazol-3-on (2 mg/l)
Thromboplastinzeit nach Quick und Fibrinogen	Thromborel® S	Lyophilisiertes Thromboplastin aus Human-Placenta, Calciumchlorid, Stabilisatoren
	Konservierungsmittel	Gentamicin (0,1 g/l), 5-Chlor-2-methyl-isothiazol-3-on und 2-Methyl-4-isothiazol-3-on (20 mg/l)
	Kalibrierplasmen 1 – 4	Lyophilisiert, aus Mischplasma von ausgewählten gesunden Spendern, Hepes-Pufferlösung (12 g/l)
Faktor V	Gerinnungsfaktor V-Mangelplasma	lyophilisiertes Humanplasma mit einer Restaktivität an Faktor V von $\leq 1\%$, durch Immunadsorption hergestellt, Heparinneutralisator Hexadimethrinbromid (5 mg/l), Mannit (20 g/l) zur Stabilisierung
Faktor VIII	Faktor X Reagenz	Lyophilisiert, ca. 2 nmol FX vom Rind, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Puffer pH 8, Stabilisatoren
	Faktor IXa Reagenz	Lyophilisiert, ca. 0,6 nmol F IXa vom Rind, ca. 0,6 nmol Thrombin vom Rind, ca. 0,06 mmol Calciumchlorid, ca. 0,12 μ mol Phospholipide, Tris-Puffer pH 8, Stabilisatoren
	Substrat Reagenz	Lyophilisiert, ca. 3,4 μ mol CH ₃ OCO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.AcOH (= chromogenes F Xa-Substrat), N α -(2-Naphthylsulfonylglycyl)-D, L-Amidinophenylalanin-piperidid (α -NAPAP) (= Thrombininhibitor), Stabilisatoren
	Stopp-Puffer	Tris-Puffer, Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumchlorid, 0,02% Natriumazid, 10 ml + 1 ml Substrat Reagenz
Antithrombin III	Thrombin-Reagenz	Thrombin vom Rind, lyophilisiert. Heparin und Aprotinin
	Substrat-Reagenz	Lyophilisiert, Tosylglycyl-L-prolyl-L-arginyl-5-amino-2-nitrobenzoesäure-isopropylamid (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA) (4 mmol/l)
	Pufferlösung	Tris-Puffer (100 mmol/l), NaCl (8,7 g/l), pH 8,2
	Konservierungsmittel	Natriumazid (< 1 g/l)

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gerinnungs-Testkits 1.

Gerinnungstest	Reagenz	Inhalt
aPTT	Pathrombin® SL Reagenz	Siliciumdioxid-Partikel, pflanzliche Phospholipide, Natriumchlorid (2,4 g/l), Hepes-Puffer (14,3 g/l), pH 7,6
	Konservierungsmittel	Natriumazid (< 1 g/l)
D-Dimere	D-Dimer PLUS Reagenz	Lyophilisiert, Polystyrol-Partikel, monoklonale Antikörper von der Maus, humanes Serumalbumin, Tricin (0,02 mol/l), Saccharose (max. 50 g/l)
	Konservierungsmittel	Natriumazid (< 1 g/l)
	D-Dimer PLUS Akzelerator	Lyophilisiert, aus einem Mischplasma von ausgewählten gesunden Spendern durch Aufstocken mit einer D-Dimer-Präparation hergestellt, mit HEPES-Pufferlösung (12 g/l)
	Konservierungsmittel	5-Chlor-2-methyl-4-isothiazol-3-on und 2-Methyl-4-isothiazol-3-on (max. 10 mg/l)
	D-Dimer PLUS Rekonstitutionsmedium	flüssig, physiologische, gepufferte Kochsalzlösung
	Konservierungsmittel	Natriumazid (< 1 g/l)
	D-Dimer PLUS Standard Plasma	Lyophilisiert, aus Mischplasma von ausgewählten, gesunden Spendern durch Zusatz einer standardisierten D-Dimer Präparation hergestellt, Hepes-Pufferlösung (12 g/l)
	Konservierungsmittel:	5-Chlor-2-methyl-4-isothiazol-3-on und 2-Methyl-4-isothiazol-3-on
TAT-Komplexe	Enzygnost® TAT micro	Mit Kaninchen-Antikörpern gegen Human-Thrombin beschichtete Mikrotitrationsplatten
	Anti-Human-ATIII/POD-Konjugat	Anti-Human-ATIII, Peroxidase-konjugiert, vom Kaninchen
	Konservierungsmittel	Phenol (< 1 g/l)
	Konjugat-Puffer	Tris-Pufferlösung (50 mmol/l), Serumalbumin vom Rind
	Konservierungsmittel	Phenol (< 0,3 g/l)
	TAT-Standard-Plasmen S1 bis S4 (human)	Konzentrationsbereich 2 bis 60 µg/l
	Konservierungsmittel	5-Chlor-2-methyl-4-isothiazol-3-on (max. 38 mg/l), 2-Methyl-4-isothiazol-3-on (max. 12,5 mg/l)
	TAT-Kontrollplasma (human)	Sollwert auf Flaschenetikett
	Konservierungsmittel	5-Chlor-2-methyl-4-isothiazol-3-on (max. 38 mg/l), 2-Methyl-4-isothiazol-3-on (max. 12,5 mg/l)
	Proben-Puffer (TAT)	Tris-Pufferlösung (100 mmol/l), Tween (10 ml/l), EDTA (37 g/l)
	Konservierungsmittel	Natriumazid (< 1 g/l)
	Waschlösung POD	Tween-haltige (18 g/l) Phosphat-Pufferlösung (90 mmol/l)
	Konservierungsmittel	Phenol (max. 1 g/l)
	Puffer/Substrat POD	Wasserstoffperoxid (0,3 g/l) in Citrat-Pufferlösung
	Konservierungsmittel	n-Butanol (max. 0,1 g/l)
	Chromogen POD	o-Phenylendiamin-dihydrochlorid
	Stopplösung POD	0,5 N Schwefelsäure

Tabelle 8: Zusammensetzung der Gerinnungs-Testkits 2.

3.10. Rheologische Untersuchungen

Näheren Einblick in die rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten war unter Verwendung des LORCA™ (Laser assisted Optical Rotational Cell Analyser, R & R Mechatronics, Zwaag, Niederlande) zu gewinnen. Dieses Gerät verfügt über die technischen Voraussetzungen zur Messung sowohl der Verformbarkeit als auch der Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten (108, 151, 152).

3.10.1. Messung der Erythrozytenverformbarkeit

Die vom LORCA™ angewandte Methode zur Bestimmung der Verformbarkeit der roten Blutkörperchen bezeichnet man als Ektazytometrie (von griechisch: ἑκταῖσις „Ausdehnung“, κύτος „Zelle“ und μέτρον „Messung, Maß“).

Der Ektazytometrie liegt zugrunde, dass Erythrozyten ihre Form von einer bikonkaven zu einer elliptischen Gestalt verändern, sobald eine Scherspannung auf sie einwirkt. Mittels einer Lichtquelle ist es möglich, diese Formveränderung, auch Elongation genannt, als ein sogenanntes Beugungsbild auf eine Bildwand zu projizieren (51, 251).

Der LORCA™ verfügt zu diesem Zweck über eine Couette-Geometrie mit einem statischen inneren Zylinder und einem rotierenden äußeren Zylinder (siehe Abb. 9). Zwischen den beiden Zylindern befindet sich ein Spalt von 0,3 mm Dicke, der mit bis zu 1,5 ml Flüssigkeit befüllt werden kann. Durch die Rotation des äußeren Zylinders wird auf die Flüssigkeit eine Scherspannung ausgeübt. Unter dem Einfluss der Scherspannung beginnt die Flüssigkeit laminar zu strömen (108, 152).

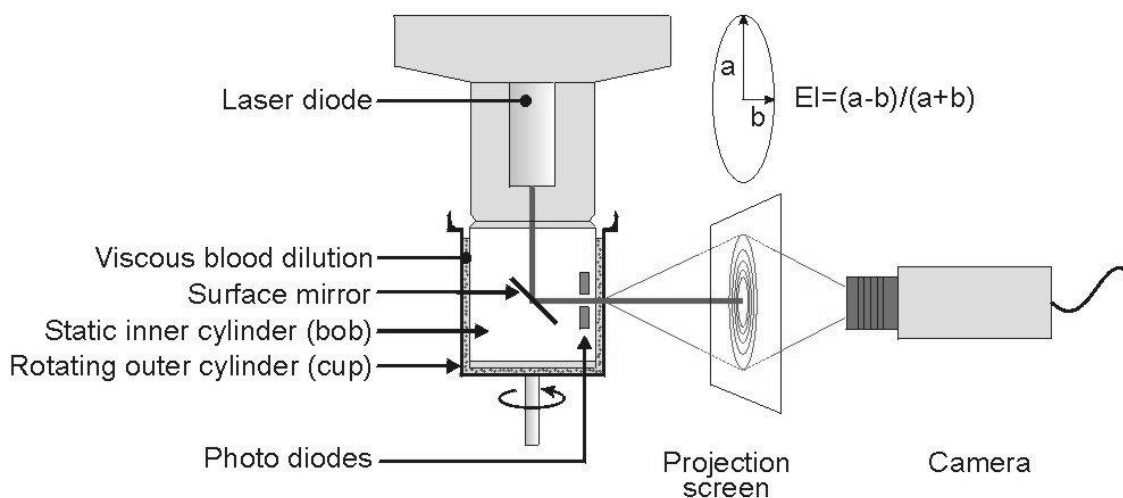


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des LORCA™ (Laser assisted optical rotational cell analyser, R & R, Mechatronics, Zwaag, Niederlande). © 2003/2004 by Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands (108).

In dem statischen inneren Zylinder ist eine Laserdiode integriert, die als Lichtquelle dient. Der Laserstrahl wird innerhalb des Zylinders so umgelenkt, dass er die Blutsuspension orthograd durchquert. Dabei wird der Laserstrahl teilweise von den Erythrozyten abgelenkt. Das so entstehende und auf eine Bildwand projizierte Beugungsbild wird von einer Kamera aufgenommen und anschließend an den Computer weitergeleitet (108, 152).

Bei der Elongationsuntersuchung von Blut sind dessen nicht-newtonische Eigenschaften zu berücksichtigen. Applikation von Scherspannung geht mit einer Viskositätsveränderung des Blutes einher. Da hingegen für die Elongationsmessung eine annähernd newtonische Flüssigkeit wünschenswert ist, wurden die Blutproben in einem hoch viskösen Medium in einem Verhältnis von 1 : 200 verdünnt. Dementsprechend wurden 25 µl Blutprobe in 5 ml Polyvinylpyrrolidon vermischt. Um physiologische Bedingungen zu generieren, ist unter dem rotierenden Zylinder eine Heizung eingebaut. Folglich konnten alle Messungen bei + 37° C durchgeführt werden (108, 152).

Berechnung der Scherspannung

$\tau = \eta \times \gamma$	$\gamma = \frac{4\pi \times r_b \times r_c}{60 \times (r_c^2 - r_b^2)} \times N$
τ = Scherspannung [Pa]	γ = Scherrate [s ⁻¹]
η = Viskosität [mPa × s]	r_b = Außenradius des inneren Zylinders (bob) in mm
γ = Scherrate [1/s]	r_c = Innenradius des äußeren Zylinders (cup) in mm
	N = Drehzahl des äußeren Zylinders (cup)

Tabelle 9: Berechnung der Scherspannung (108).

Unter dem Einfluss der Scherspannung dehnen sich die Erythrozyten aus. Mit zunehmender Scherspannung verändert sich die Form der roten Blutkörperchen von der anfänglich bikonkaven Gestalt hin zu einer Ellipse. Dabei orientieren sich die Erythrozyten entlang dem Strömungsvektor tangential zu ihrer Achse. Begleitend verändert sich das Beugungsbild. Der Computer berechnet anhand des Beugungsbildes aus der horizontalen (B) und der vertikalen (A) Achse der registrierten Ellipse einen dimensionslosen Elongations-Index zur Beschreibung der Erythrozytenform (Elongations-Index = EI, siehe Abb. 10) (108, 152).

In einer Elongationskurve wurde der so errechnete EI gegen die Scherrate aufgetragen. Zu einer gewählten Schergeschwindigkeit konnte somit die zugehörige Form des Erythrozyten dargestellt werden. Während der Elongationsmessung wurde die Scherspannung in insgesamt neun logarithmischen Schritten von 0,3 bis 30 Pa erhöht. Um Ausreißer zu

eliminieren, wurde jeder Scherungsschritt in einen Wiederholungsvorgang integriert. Die am weitesten vom Durchschnitt entfernt liegenden Daten wurden verworfen. Insgesamt waren für jeden Schritt 50 valide Messungen erforderlich, um eine Ellipse zu beschreiben (108, 152).

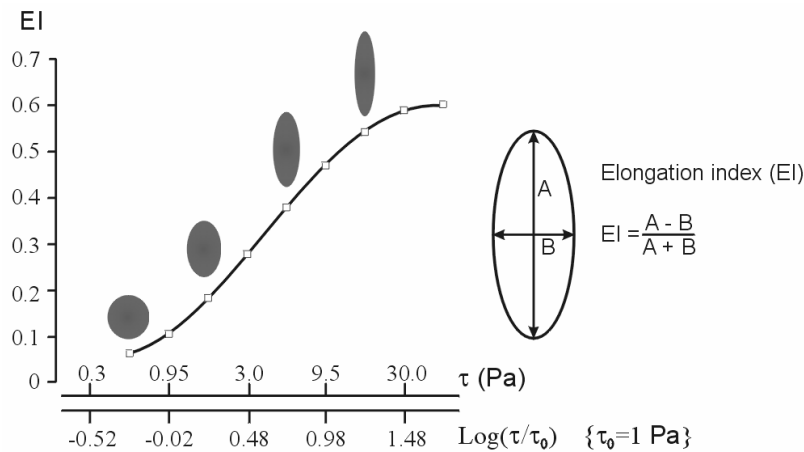


Abbildung 10: Verformbarkeitskurve, auf der x-Achse ist die Scherspannung, auf der y-Achse der Elongations-Index aufgetragen. Der Elongations-Index berechnet sich aus der horizontalen (B) und der vertikalen (A) Achse der registrierten Ellipse. © 2003/2004 by Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands (108).

3.10.2. Messung der Erythrozytenaggregation

Die erstmals von Zijlstra 1957 beschriebene Syllektometrie (von griechisch συλλέγειν „zusammenkommen, sich zusammenscharen“ und μέτρον „Messung, Maß“) ist eine etablierte Methode zur Messung der Aggregationsfähigkeit von roten Blutkörperchen (108, 151, 399).

Wirkt auf Erythrozyten eine Scherspannung, so verformen sich diese nicht nur, sondern verteilen sich bekanntermaßen gleichmäßig im Blut. Reduziert man die Scherspannung oder kommt der Blutfluss zum Erliegen (Stase), kommt es zur Ausbildung von Aggregaten, der so genannten Rouleaux-Formation. Es hat sich gezeigt, dass bei der Bildung von Aggregaten die Lichtdurchlässigkeit einer Blutsuspension zunimmt. Ursächlich hierfür sind die sich zwischen den Aggregaten ausbildenden Lücken (151).

Dem Prinzip der Syllektometrie folgend, wird beim LORCA™ mittels der als Lichtquelle dienenden Laserdiode die Blutprobe illuminiert. Über die Rotation des äußeren Zylinders wird eine Scherspannung generiert. Um sämtliche bestehende Aggregate aufzulösen, ist

initial eine hohe Scherrate von 500 s^{-1} notwendig. Sofort nach dem abrupten Anhalten der Zylinderrotation erfolgt die Messung des von den Erythrozyten zurückgestrahlten Lichtes. Wie auf der Abbildung 9 zu sehen, sind zu diesem Zweck Photodioden in dem inneren Zylinder integriert (108, 152).

Anders als bei der Verformbarkeitsmessung beeinflusst die Blutviskosität die Messung nicht. Hingegen beeinflusst die Sauerstoffsättigung der Erythrozyten die Messergebnisse erheblich. Die Rückstrahlungsintensität verändert sich mit abfallenden oder steigenden Sättigungswerten. Ausreichende Sauerstoffsättigung resultiert in einer erhöhten Rückstrahlungsintensität der Erythrozyten. Um eine Sauerstoffsättigung von 99 bis 100 % zu erhalten, wurden 2 ml der in der Untersuchung verwendeten Vollblutproben vor jeder Messung in 40 ml Kulturröhrchen für 15 Minuten gerollt. Da sich Temperaturunterschiede ebenfalls auf die Ergebnisse auswirken, erfolgten die Messungen bei $+ 37^\circ \text{ C}$ (151, 152).

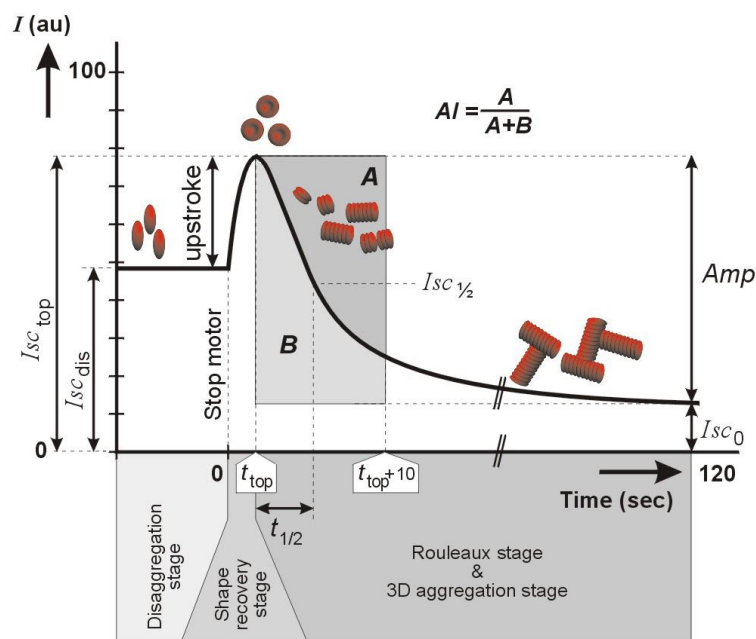


Abbildung 11: Syllektogramm mit den vier Stadien des Messablaufes. Die Intensität der Rückstrahlung (I_{sc}) wird in Arbitrary Units (au) angegeben. Errechnung des Aggregations-Index AI (in %). © 2003/2004 by Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands (108).

Die erhaltenen Messergebnisse wurden in einem Syllektogramm graphisch beschrieben (siehe Abb. 11). Insgesamt vier Stadien klassifizieren den Messablauf:

1. Das anfangs beschriebene Plateau wird durch die gleichmäßige Rückstrahlung der unter dem Einfluss von Scherspannung elongierten Erythrozyten bestimmt.

2. Mit dem abrupten Anhalten des rotierenden Zylinders verlieren die Erythrozyten ihre Ausrichtung in der Strömung und gelangen zu ihrer bikonkaven Form zurück. Die daraus resultierende exponentielle Erhöhung der Rückstrahlungsintensität drückt sich in einem Peak aus (siehe Abb. 11).
3. In den folgenden ein bis drei Sekunden beginnen die Erythrozyten mit der Bildung von Rouleaux-Formationen,
4. welche in den anschließenden zehn bis 25 Sekunden zu 3D-Aggregaten mit End-zu-End- und Seit-zu-End-Verbindungen aggregieren. Die Intensität der Rückstrahlung (I_{sc}) nimmt mit fortschreitendem Aggregationsprozess ab, da aufgrund der sich bildenden Lücken vermehrt Licht durch das Blut hindurch transmittiert (108).

Um die Aggregationsfähigkeit zu quantifizieren, wurde aus den Flächeninhalten A und B des Syllektogramms ein Aggregations-Index AI berechnet (siehe Abb. 11). Die Flächen A und B beschreiben die Flächeninhalte oberhalb (A) und unterhalb (B) der Aggregationskurve von dem Zeitpunkt der maximalen Desaggregation t_{top} über die Zeitspanne von zehn Sekunden bis $t_{top} + 10$. Der AI wird in % angegeben (108, 151).

Als ein weiterer aus dem Syllektogramm abzuleitender Parameter sei hier $t_{1/2}$ zu erwähnen. $t_{1/2}$ beschreibt die Zeitspanne von der maximalen Desaggregation (der Peak auf Abb. 11) bis zum Erreichen der Hälfte der Amplitude des Aggregationsprozesses ($I_{sc,1/2}$) und erweist sich als geeigneter Wert, um die Schnelligkeit der Aggregatbildung zu bestimmen; wohlgemerkt nach zuvor erfolgter vollständiger Desaggregation (108, 151).

3.11. Statistik

Die statistische Analyse dieser Studie erfolgte mit Prozeduren der Statistiksoftware SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, N.C., USA). Graphische Darstellungen der Ergebnisse wurden mit dem Programm SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) umgesetzt.

Die Mittelwerte beider Untersuchungsgruppen wurden anhand des t-Tests miteinander verglichen. Der t-Test setzt eine normalverteilte Grundgesamtheit sowie Gleichheit und Homogenität der Varianzen voraus. Letztere wurden mit dem F-Test geprüft. Zur Analyse nicht normalverteilter Daten wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewendet. Dieser Rangsummentest vergleicht die Mediane der beiden Untersuchungsgruppen miteinander. Alle Tests erfolgten zweiseitig bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$, d. h. p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Des Weiteren wurde für sämtliche Untersuchungseinheiten für jeden Messparameter eine „Area under the curve“ (AUC) über den gesamten Beobachtungszeitraum berechnet. Diese Kalkulation basiert auf der Trapezregel:

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i)(y_i + y_{i+1})$$

wobei t die Zeit, in der vorliegenden Studie die Messtage, und y die einzelnen Messergebnisse beschreiben. Mit dieser Methode war es möglich, die über den Lagerungszeitraum gewonnenen Ergebnisse jedes Untersuchungsparameters individuell für jede Untersuchungseinheit als eine Art gewichteter Durchschnittswert zusammenfassen. Die kalkulierten AUC-Werte konnten anschließend mit den geläufigen statistischen Tests gruppenabhängig geprüft werden (241).

4. Ergebnisse

Die für die einzelnen Untersuchungsparameter über den Untersuchungszeitraum von 49 Tagen von jeder Blutkonserve errechneten AUC-Werte sind gruppenabhängig zusammengefasst und als Mittelwert und Standardabweichung pro Tag beschrieben. Zusätzlich sind die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), der jeweils kleinste und größte Wert und das 95 %-Konfidenzintervall zu jedem Untersuchungsparameter und jedem Messtag in Tabellen präsentiert. Die Ergebnisse des mit der neuartigen Blutentnahmetechnik untersuchten Blutes wurden in der „ABC-Gruppe“ (ABC®-Waage, Automated Blood Collection) zusammengefasst, die Ergebnisse der konventionellen Blutentnahmetechnik in der „konventionellen Gruppe“. Referenzwerte sind aus den Richtlinien der Bundesärztekammer und des Council of Europe zitiert (71, 120).

4.1. Blutspender

Die Blutspender waren in Bezug auf ihr Geschlecht und ihre Blutgruppe gleichmäßig auf die Untersuchungsgruppen aufgeteilt. Hinsichtlich der gemittelten Werte und der Varianzen des Hämoglobingehaltes (Hb), der Thromboplastinzeit nach Quick (PT), der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) und der Fibrinogenkonzentration der Spender zeigte sich die Verteilung auf die ABC- und die konventionelle Gruppe annähernd gleich. Es gab keine signifikanten Differenzen, wobei der Hb-Wert vor der Spende in der konventionellen Gruppe eine nicht-signifikante höhere Variation aufwies. Die einzelnen Werte sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

		ABC-Gruppe	Konventionelle Gruppe	p-Wert
Geschlecht	m/w [n]	10/10	10/10	n. b.
Blutgruppe	A/0 [n]	10/10	10/10	n. b.
Hb vor der Spende	[mg/l]	149 (10,1)	150 (14,0)	0,73
PT vor der Spende	[%]	100 (91-100)	100 (92-100)	0,72 †
aPTT vor der Spende	[Sek.]	30,9 (3,7)	30,7 (3,3)	0,89
Fibrinogen vor der Spende	[g/l]	2,9 (0,5)	2,9 (0,4)	0,94

Tabelle 10: gruppenspezifische Aufteilung nach Geschlecht und Blutgruppe sowie Parameter vor der Spende. † Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Daten. In Klammern Standardabweichung; n. b.: nicht bestimmt.

4.2. Waagen und Blutkonserven

Die mit der ABC®-MacoPharma-Waage und dem Fresenius-Compomixer M2® gewonnenen Vollblutkonserven wiesen mit 525 (SD 5,3) ml respektive 524 (SD 10,2) ml ungefähr gleiche Volumina auf. In der konventionellen Gruppe zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Variation der Konservenvolumina ($p = 0,006$). Ebenfalls fand sich eine signifikant höhere Variation bei dem durch den Filtrationsprozess verursachten Blutverlust (Filtrationsverlust) in der konventionellen Gruppe ($p = 0,0002$). Sowohl die Spende- als auch die Filtrationsdauer lagen jeweils in beiden Gruppen nahe beieinander. Der Hämoglobingehalt der Blutkonserven von 65,9 (SD 5,1) g pro Konserve in der ABC-Gruppe bzw. 67,5 (SD 7,8) g pro Konserve in der konventionellen Gruppe tendierte in der konventionellen Gruppe zu einer höheren Variation ($p = 0,07$). Ein Einfluss der höheren Variabilität des Vorspende-Hbs in der konventionellen Gruppe auf die höhere Variation des Nettovolumens der Vollblutkonserven und auf den Filtrationsverlust in der konventionellen Gruppe zeigte sich nicht ($p = 0,44$ und $p = 0,27$).

Der Leukozytengehalt lag in beiden Gruppen unter 2×10^5 Restleukozyten. Damit wurde der festgelegte Referenzwert von 1×10^6 Restleukozyten pro Blutkonserve deutlich unterschritten (120). Tabelle 11 gibt einen Überblick über die beschriebenen Parameter.

		ABC-Gruppe	Konventionelle Gruppe	p-Wert
Spendedauer	[Sek.]	411 (55)	395 (68)	0,42 (0,01*)
Filtrationsdauer	[Min.]	31 (22-53)	35 (28-60)	0,09 †
Filtrationsverlust	[ml]	44,1 (1,7)	46,0 (4,2)	0,07 (0,0002*)
Nettovolumen	[ml]	525 (5,3)	524 (10,2)	0,45 (0,006*)
Hb-Gehalt	[g/Konserve]	65,9 (5,1)	67,5 (7,8)	0,45 (0,07*)
Leukozyten	[10^5 /Konserve]	0,66 (0,26-1,58)	0,65 (0,00-1,61)	0,63 †

Tabelle 11: gruppenspezifische Spendeparameter und Restleukozytengehalt. In Klammern Standardabweichung bzw. Variation. * F-Test (Varianzanalyse); † Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Daten.

4.3. Metabolismus

4.3.1. pH-Wert

Der initiale pH-Wert von 7,31 in beiden Untersuchungsgruppen verminderte sich auf 6,73 (SD 0,05) in der ABC-Gruppe und auf 6,76 (SD 0,05) in der konventionellen Gruppe am 49. Tag der Lagerung. Die mithilfe der AUC-Prozedur kalkulierten Werte von 6,94 (SD 0,04) in der ABC-Gruppe und 6,95 (SD 0,04) in der konventionellen Gruppe beschreiben annähernd gleiche pH-Verhältnisse in beiden Untersuchungsgruppen ($p = 0,48$).

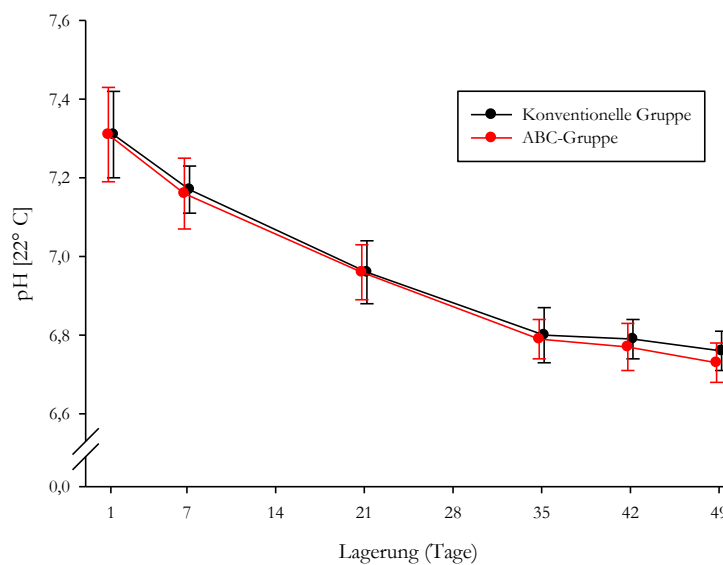


Abbildung 12: Kurvenverlauf des pH-Wertes über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	7,31 (0,12)	7,11	7,60	[7,26; 7,35]
7	20	7,16 (0,09)	7,01	7,32	[7,13; 7,20]
21	20	6,96 (0,07)	6,83	7,12	[6,93; 6,99]
35	20	6,79 (0,05)	6,67	6,90	[6,77; 6,81]
42	20	6,77 (0,06)	6,65	6,88	[6,75; 6,80]
49	20	6,73 (0,05)	6,63	6,78	[6,71; 6,75]

Tabelle 12: pH-Wert bei 22° C, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	7,31 (0,11)	7,15	7,57	[7,26; 7,35]
7	20	7,17 (0,06)	7,08	7,30	[7,15; 7,20]
21	20	6,96 (0,08)	6,84	7,19	[6,93; 7,00]
35	20	6,80 (0,07)	6,66	6,89	[6,77; 6,83]
42	20	6,79 (0,05)	6,70	6,86	[6,77; 6,81]
49	20	6,76 (0,05)	6,65	6,85	[6,74; 6,78]

Tabelle 13: pH-Wert bei 22° C, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.3.2. Glukose

Der Glukoseverbrauch in den gelagerten Vollblutkonserven verdeutlichte sich in einer kontinuierlichen Abnahme der Glukosekonzentration. Die Konserven beider Gruppen zeigten in etwa gleiche Ausgangskonzentrationen von 434,4 (SD 25,3) mg/dl (ABC-Gruppe) bzw. 423,20 (SD 11,72) mg/dl (konventionelle Gruppe). Am 49. Tag enthielten die Konserven der ABC-Gruppe durchschnittlich 220,3 (SD 38,7) mg/dl, die Konserven der konventionellen Gruppe noch durchschnittlich 214,3 (SD 30,6) mg/dl Glukose. Die mittleren Konzentrationen (AUC pro Tag) betrugen 305,8 (SD 30,4) mg/dl für die ABC-Gruppe und 291,4 (SD 46,4) mg/dl für die konventionelle Gruppe ($p = 0,26$).

Es ließ sich eine Tendenz zu einer erhöhten Variation der Glukosekonzentration in der konventionellen Gruppe erkennen ($p = 0,07$).

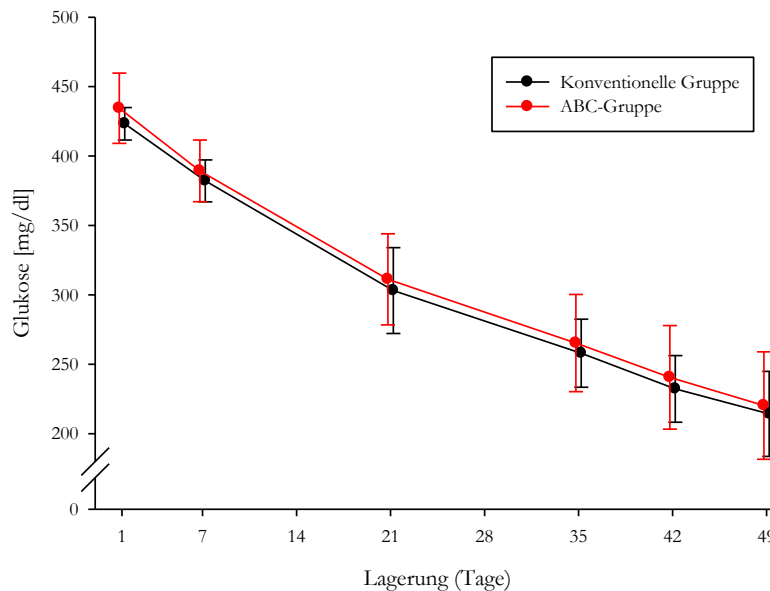


Abbildung 13: Kurvenverlauf der Glukose-Konzentration in mg/dl über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	19	434,4 (25,3)	368	488	[424,3; 444,4]
7	20	389,3 (22,2)	324	415	[380,8; 397,9]
21	20	311,2 (32,8)	221	351	[298,6; 323,9]
35	20	265,3 (35,0)	159	315	[251,8; 278,9]
42	20	240,6 (37,3)	128	293	[226,2; 255,0]
49	20	220,3 (38,7)	107	268	[205,3; 235,3]

Tabelle 14: Glukose in mg/dl, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	423,2 (11,7)	407	445	[418,7; 427,7]
7	20	382,1 (15,1)	356	413	[376,3; 388,0]
21	19	303,1 (30,9)	204	351	[290,8; 315,3]
35	20	258,0 (24,5)	197	312	[248,6; 267,5]
42	20	232,3 (24,0)	171	285	[223,1; 241,6]
49	20	214,3 (30,6)	138	277	[202,5; 226,2]

Tabelle 15: Glukose in mg/dl, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.3.3. Laktat

Laktat, als Endprodukt der anaeroben Glykolyse, reicherte sich über die 49 Tage Lagerungszeit bis zu einer Konzentration von 23,8 (SD 3,1) mmol/l in den Konserven der ABC-Gruppe und 23,3 (SD 2,4) mmol/l in den Konserven der konventionellen Gruppe an. Mithilfe der AUC-Prozedur errechnete sich für die ABC-Gruppe ein Wert von 15,6 (SD 1,6) mmol/l und für die konventionelle Gruppe betrug der Wert 15,4 (SD 1,4) mmol/l. Die beiden Untersuchungsgruppen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Laktatkonzentrationen nicht signifikant ($p = 0,69$), der Kurvenverlauf zeigte sich annähernd gleichartig.

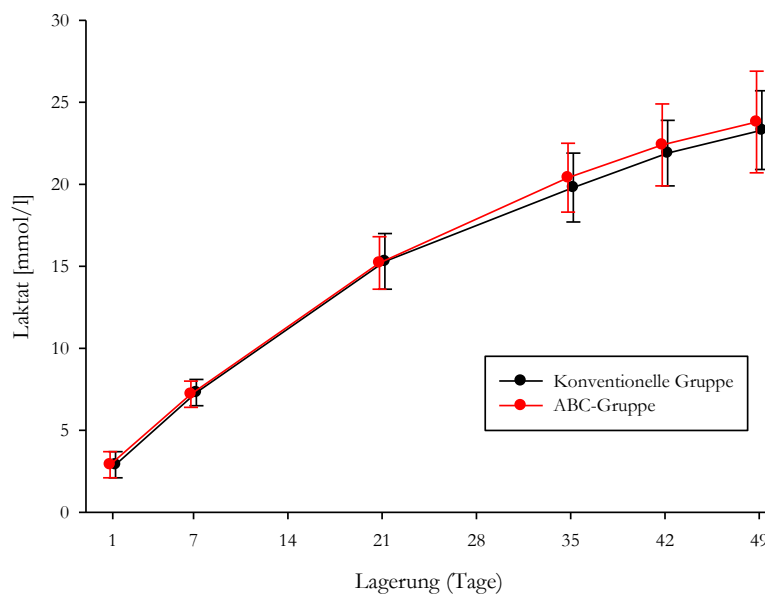


Abbildung 14: Kurvenverlauf der Laktat-Konzentration in mmol/l über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	2,9 (0,8)	1,7	5,2	[2,6; 3,1]
7	20	7,2 (0,8)	5,8	8,8	[6,9; 7,5]
21	20	15,2 (1,6)	13,1	19,0	[14,6; 15,8]
35	20	20,4 (2,1)	18,0	25,0	[19,6; 21,3]
42	20	22,4 (2,5)	19,0	27,0	[21,5; 23,4]
49	20	23,8 (3,1)	20,0	31,0	[22,6; 25,1]

Tabelle 16: Laktat in mmol/l, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	2,9 (0,8)	1,8	4,4	[2,6; 3,2]
7	20	7,3 (0,8)	5,5	9,1	[7,0; 7,6]
21	20	15,3 (1,7)	13,0	18,0	[14,7; 16,0]
35	20	19,8 (2,1)	17,0	25,0	[19,0; 20,6]
42	20	21,9 (2,0)	19,0	26,0	[21,1; 22,7]
49	20	23,3 (2,4)	19,0	28,0	[22,4; 24,2]

Tabelle 17: Laktat in mmol/l, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.3.4. ATP

Die Ausgangskonzentrationen von ATP waren am ersten Lagerungstag 3,53 (SD 0,41) $\mu\text{mol/g Hb}$ in der ABC-Gruppe und 3,52 (SD 0,37) $\mu\text{mol/g Hb}$ in der konventionellen Gruppe. Bis zum siebten Tag der Lagerung stieg in beiden Gruppen die Konzentration an, um dann in der Folge kontinuierlich abzunehmen. Am 49. Tag lag die Konzentration in der ABC-Gruppe bei einem Wert von 1,69 (SD 0,50) $\mu\text{mol/g Hb}$ und in der konventionellen Gruppe bei einem Wert von 1,66 (SD 0,37) $\mu\text{mol/g Hb}$. Die als AUC pro Tag errechneten Werte ergaben ein Gehalt von 3,11 (SD 0,40) $\mu\text{mol/g Hb}$ in der ABC-Gruppe bzw. 3,05 (SD 0,36) $\mu\text{mol/g Hb}$ in der konventionellen Gruppe. Sowohl der Kurvenverlauf als auch die statistische Analyse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen ($p = 0,61$).

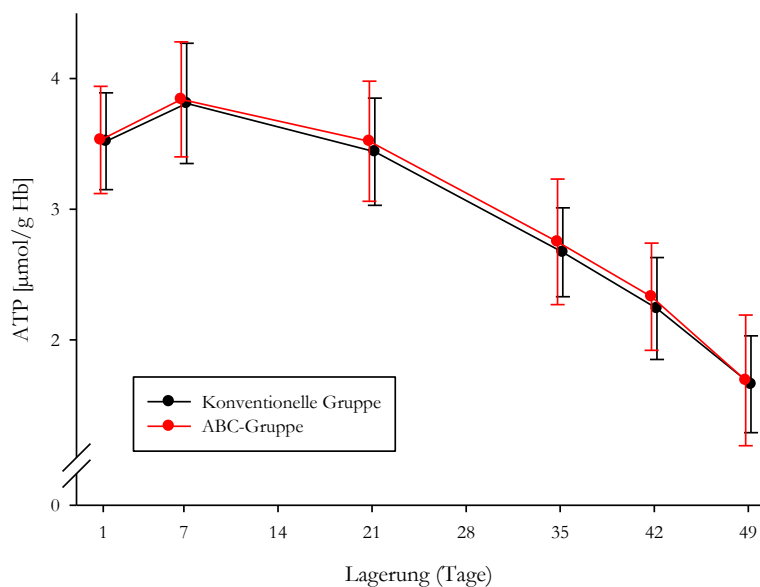


Abbildung 15: Kurvenverlauf der ATP-Konzentration in $\mu\text{mol/g Hb}$ über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	3,53 (0,41)	2,63	4,33	[3,37; 3,69]
7	20	3,84 (0,44)	2,94	4,52	[3,67; 4,01]
21	20	3,52 (0,46)	2,77	4,50	[3,34; 3,70]
35	20	2,75 (0,48)	1,99	3,67	[2,57; 2,94]
42	20	2,33 (0,41)	1,70	3,23	[2,17; 2,49]
49	20	1,69 (0,50)	0,65	2,67	[1,50; 1,88]

Tabelle 18: ATP in $\mu\text{mol/g}$ Hb, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	3,52 (0,37)	2,91	4,29	[3,37; 3,66]
7	20	3,81 (0,46)	3,08	5,18	[3,63; 3,98]
21	20	3,44 (0,41)	2,79	4,36	[3,28; 3,60]
35	20	2,67 (0,34)	2,05	3,45	[2,54; 2,80]
42	20	2,24 (0,39)	1,60	3,21	[2,09; 2,39]
49	20	1,66 (0,37)	1,00	2,68	[1,52; 1,81]

Tabelle 19: ATP in $\mu\text{mol/g}$ Hb, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.3.5. 2,3-DPG

Der Gehalt an 2,3-Diphosphoglycerat fiel in beiden Gruppen sehr schnell ab. Am siebten Tag hatte sich die Konzentration von anfänglich 17,40 (SD 20,87) $\mu\text{mol/g}$ Hb in der ABC-Gruppe bzw. 15,20 (SD 14,45) $\mu\text{mol/g}$ Hb in der konventionellen Gruppe auf 7,84 (SD 2,48) $\mu\text{mol/g}$ Hb und 8,10 (SD 3,12) $\mu\text{mol/g}$ Hb vermindert, was einer Reduktion des Ausgangswertes von ca. 45 % in der ABC-Gruppe und ca. 53,3 % in der konventionellen Gruppe entspricht. Am 35. Tag war die Konzentration auf ein Minimum von 1,26 (SD 1,07) $\mu\text{mol/g}$ Hb in der ABC-Gruppe respektive 1,32 (SD 0,83) $\mu\text{mol/g}$ Hb (konventionelle Gruppe) gefallen. Damit betrug der 2,3-DPG-Gehalt nur noch 7,2 % bzw. 8,7 % des Ausgangsgehaltes. Die Untersuchung wurde mit dem 42. Lagerungstag beendet. Die AUC-Werte lagen bei 0,54 (SD 0,25) $\mu\text{mol/g}$ Hb (ABC-Gruppe) und bei 0,54 (SD 0,20) $\mu\text{mol/g}$ Hb (konventionelle Gruppe) und stellten annähernd gleiche Verhältnisse in beiden Gruppen dar ($p = 0,99$).

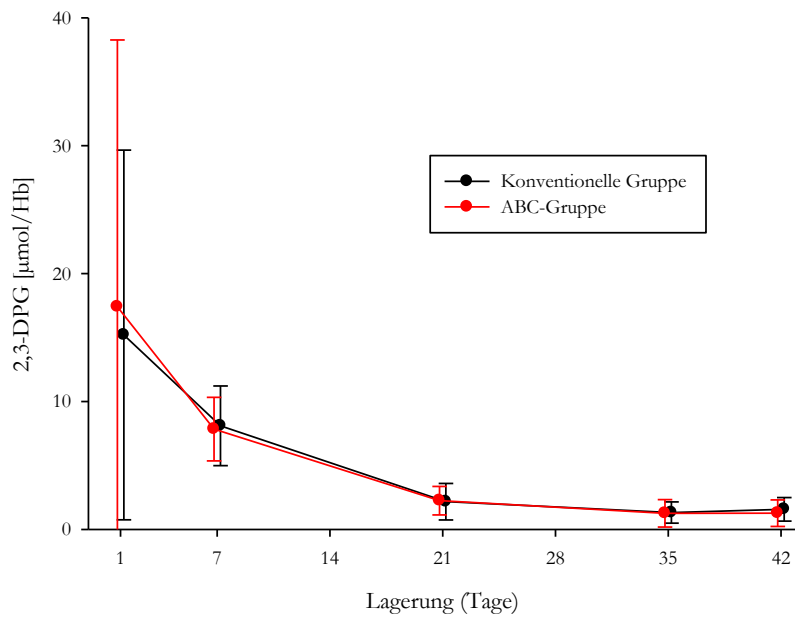


Abbildung 16: Kurvenverlauf der 2,3-DPG-Konzentration in µmol/Hb über 42 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	17,40 (20,87)	6,82	85,45	[9,33; 25,47]
7	20	7,84 (2,48)	3,68	13,30	[6,88; 8,80]
21	20	2,25 (1,11)	0,54	5,09	[1,82; 2,68]
35	20	1,26 (1,07)	0,19	3,93	[0,84; 1,67]
42	20	1,27 (1,04)	0,26	3,84	[0,86; 1,67]

Tabelle 20: 2,3-DPG in µmol/g Hb, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	15,20 (14,45)	7,03	63,19	[9,62; 20,79]
7	20	8,10 (3,12)	1,12	17,45	[6,90; 9,31]
21	20	2,17 (1,43)	0,30	6,32	[1,62; 2,72]
35	20	1,32 (0,83)	0,00	2,73	[1,00; 1,64]
42	20	1,57 (0,92)	0,16	3,19	[1,22; 1,93]

Tabelle 21: 2,3-DPG in µmol/g Hb, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.4. Hämolyseparameter

4.4.1. Freies Hämoglobin

Die Konzentration von freiem Hämoglobin (fHb) erhöhte sich in beiden Untersuchungsgruppen über die Lagerungszeit annähernd gleichartig. Der Gehalt an fHb pro Konserve lag am ersten Tag in der ABC-Gruppe bei 0,13 (SD 0,04) g, in der konventionellen Gruppe bei 0,15 (SD 0,10) g. Am Ende der Lagerungszeit betrug der freie Hb-Gehalt in der ABC-Gruppe 0,49 (SD 0,16) g pro Konserve und 0,47 (SD 0,15) g pro Konserve in der konventionellen Gruppe. Die anhand der AUC-Prozedur errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen pro Tag lagen in der ABC-Gruppe bei 0,29 (SD 0,08) g/Konserve bzw. bei 0,30 (SD 0,12) g/Konserve in der konventionellen Gruppe ($p = 0,71$).

In der konventionellen Gruppe zeigte sich eine signifikant erhöhte Variation des fHb-Gehaltes ($p = 0,04$).

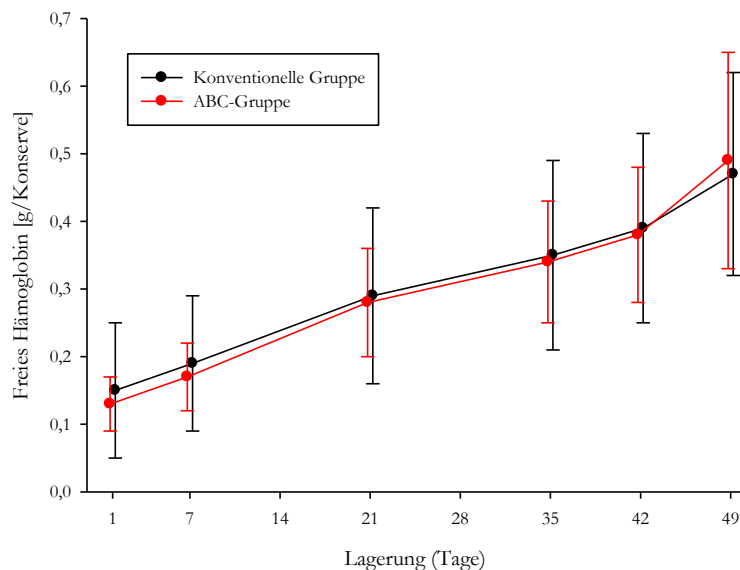


Abbildung 17: Kurvenverlauf des freien Hämoglobins in g pro Vollblutkonserve über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	0,13 (0,04)	0,08	0,21	[0,11; 0,14]
7	20	0,17 (0,05)	0,09	0,26	[0,15; 0,19]
21	20	0,28 (0,08)	0,13	0,41	[0,24; 0,31]
35	20	0,34 (0,09)	0,20	0,57	[0,31; 0,38]
42	20	0,38 (0,10)	0,22	0,55	[0,34; 0,42]
49	20	0,49 (0,16)	0,26	0,90	[0,42; 0,55]

Tabelle 22: fHb in g/Konserve, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	0,15 (0,10)	0,002	0,47	[0,11; 0,19]
7	20	0,19 (0,10)	0,06	0,50	[0,15; 0,23]
21	20	0,29 (0,13)	0,10	0,67	[0,24; 0,34]
35	20	0,35 (0,14)	0,15	0,70	[0,30; 0,40]
42	20	0,39 (0,14)	0,21	0,75	[0,34; 0,45]
49	20	0,47 (0,15)	0,27	0,83	[0,41; 0,53]

Tabelle 23: fHb in g/Konserve, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.4.2. Hämolyserate

Die Erythrozyten unterlagen während der Lagerungszeit einer progredienten Hämolysen. Der Kurvenverlauf verhält sich annähernd gleich zu dem Kurvenverlauf des freien Hämoglobins. Am letzten Untersuchungstag lag die Hämolyserate bei 0,47 (SD 0,14) % in der ABC-Gruppe bzw. bei 0,44 (SD 0,13) % in der konventionellen Gruppe. Damit befand sich die Hämolyserate in beiden Untersuchungsgruppen deutlich unter dem Referenzwert von 0,8 % für Vollblutkonserven (120). Basierend auf der AUC-Kalkulation betrug die mittlere Hämolyserate in der ABC-Gruppe 0,28 (SD 0,08) % und in der konventionellen Gruppe 0,28 (SD 0,11) % (AUC pro Tag). Zwischen den beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,93$).

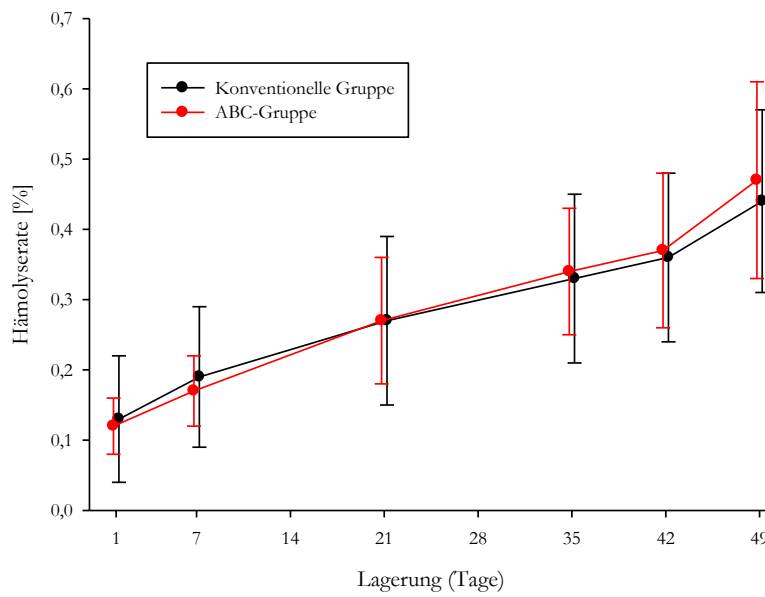


Abbildung 18: Kurvenverlauf der Hämolyserate in % über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	0,12 (0,04)	0,07	0,21	[0,11; 0,14]
7	20	0,17 (0,05)	0,09	0,26	[0,15; 0,19]
21	20	0,27 (0,09)	0,11	0,41	[0,24; 0,30]
35	20	0,34 (0,09)	0,20	0,48	[0,30; 0,37]
42	20	0,37 (0,11)	0,22	0,61	[0,33; 0,41]
49	20	0,47 (0,14)	0,25	0,74	[0,41; 0,53]

Tabelle 24: Hämolyserate in %, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	0,13 (0,09)	0,002	0,46	[0,10; 0,17]
7	20	0,19 (0,10)	0,09	0,50	[0,15; 0,22]
21	20	0,27 (0,12)	0,12	0,63	[0,22; 0,32]
35	20	0,33 (0,12)	0,19	0,67	[0,28; 0,37]
42	20	0,36 (0,12)	0,21	0,70	[0,32; 0,41]
49	20	0,44 (0,13)	0,28	0,81	[0,39; 0,49]

Tabelle 25: Hämolyserate in %, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.4.3. Kalium

Mit zunehmender Hämolyse akkumulierte der Kaliumgehalt in den Konserven von 1,44 (SD 0,11) mmol in der ABC-Gruppe und 1,42 (SD 0,12) mmol in der konventionellen Gruppe am ersten Messungstag auf 9,97 (SD 0,63) mmol bzw. 9,99 (SD 0,85) mmol am 49. Lagerungstag. Der Kurvenverlauf liegt in beiden Gruppen nahe beieinander. Die AUC-Werte ergaben 6,55 (SD 0,66) mmol pro Konserve in der ABC-Gruppe und 6,55 (SD 1,07) mmol pro Konserve in der konventionellen Gruppe ($p = 0,99$).

Es ließ sich eine signifikant erhöhte Variation des Kaliumgehaltes pro Blutkonserve in der konventionellen Gruppe nachweisen ($p = 0,04$).

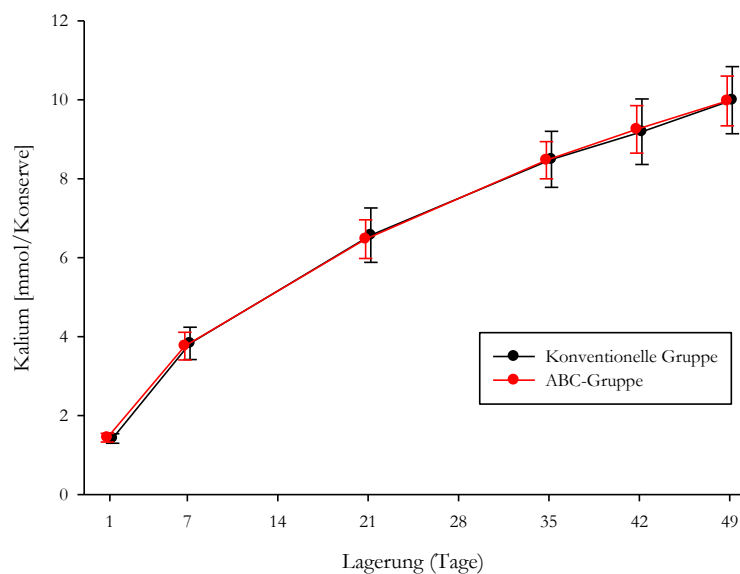


Abbildung 19: Kurvenverlauf der Kalium-Konzentration in mmol pro Konserve über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	1,44 (0,11)	1,26	1,70	[1,40; 1,48]
7	20	3,76 (0,35)	3,18	4,81	[3,62; 3,90]
21	20	6,47 (0,49)	5,17	7,28	[6,28; 6,66]
35	20	8,47 (0,47)	7,72	9,11	[8,28; 8,65]
42	19	9,25 (0,60)	8,48	10,18	[9,01; 9,49]
49	20	9,97 (0,63)	9,02	11,11	[9,72; 10,21]

Tabelle 26: Kalium in mmol, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	1,42 (0,12)	1,19	1,60	[1,37; 1,46]
7	20	3,83 (0,41)	3,22	5,10	[3,67; 3,99]
21	19	6,57 (0,69)	5,03	7,99	[6,29; 6,84]
35	20	8,49 (0,71)	7,08	9,91	[8,22; 7,76]
42	20	9,19 (0,83)	7,55	10,91	[8,87; 9,51]
49	20	9,99 (0,85)	8,10	11,35	[9,66; 10,32]

Tabelle 27: Kalium in mmol, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.5. Gerinnung

4.5.1. Gerinnungszeiten

4.5.1.1. Thrombinzeit (TT)

Die Thrombinzeit (TT) stieg im Verlauf der Lagerung in beiden Untersuchungsgruppen nur leicht an. Ausgehend von 21 (SD 1,4) Sekunden in der ABC-Gruppe erhöhte sie sich bis zum 49. Lagerungstag auf 22 (SD 1,3) Sekunden. In der konventionellen Gruppe verlängerte sich die TT von 21 (SD 1,5) Sekunden (Tag 1) auf 23,5 (SD 8,3) Sekunden (Tag 49). Als mittlere Thrombinzeit (AUC pro Tag) ergaben sich 21,6 (SD 1,4) Sekunden in der ABC-Gruppe und 21,9 (SD 3,7) Sekunden in der konventionellen Gruppe ($p = 0,76$).

Auffällig zeigten sich deutlich abweichende Gerinnungsparameter der Konserve Nr. 12. Die Werte der Konserve Nr. 12 sind in den folgenden Tabellen in Klammern präsentiert.

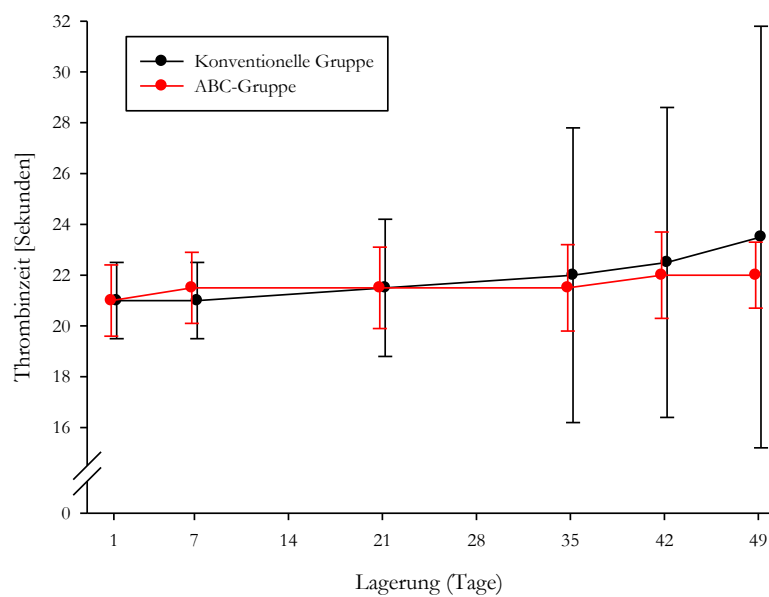


Abbildung 20: Kurvenverlauf der Thrombinzeit in Sekunden über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	21 (1,4)	19	24	[20,5; 22,0]
7	20	21,5 (1,4)	19	24	[21,0; 22,0]
21	20	21,5 (1,6)	19	25	[21,0; 22,0]
35	20	21,5 (1,7)	19	25	[21,0; 22,0]
42	20	22 (1,7)	19	25	[21,5; 22,5]
49	20	22 (1,3)	20	24	[21,5; 22,5]

Tabelle 28: Thrombinzeit in Sekunden, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	21 (1,5)	19	24	[20,5; 21,5]
7	20	21 (1,5)	19	26	[20,5; 22,0]
21	20	21,5 (2,7)	19	26 (31)	[20,5; 22,5]
35	20	22 (5,8)	19	25 (46)	[20,0; 24,5]
42	20	22,5 (6,1)	19	25 (48)	[20,5; 25,0]
49	20	23,5 (8,3)	19	26 (58)	[20,0; 26,5]

Tabelle 29: Thrombinzeit in Sekunden, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. In Klammern größte Werte der Konserve Nr. 12.

4.5.1.2. Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

In den ersten sieben Lagerungstagen folgte der Kurvenverlauf der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) einem verhältnismäßig steilen Anstieg. Ausgehend von 36,5 (SD 4,1) Sekunden in der ABC-Gruppe und ebenfalls 36,5 (SD 4,1) Sekunden in der konventionellen Gruppe betrugen die Zeiten am siebten Tag 40 (SD 4,9) Sekunden (ABC-Gruppe) bzw. 40,5 (SD 4,9) Sekunden (konventionelle Gruppe). Darauf folgte ein eher verlangsamter Anstieg der aPTT auf 42,5 (SD 7,3) Sekunden (ABC-Gruppe) und 41,5 (SD 7,1) Sekunden (konventionelle Gruppe) bis zum 49. Lagerungstag. Mit der AUC-Prozedur errechneten sich gemittelte Zeiten von 40,9 (SD 5,8) Sekunden für die ABC-Gruppe und 40,7 (SD 5,4) Sekunden für die konventionelle Gruppe ($p = 0,90$).

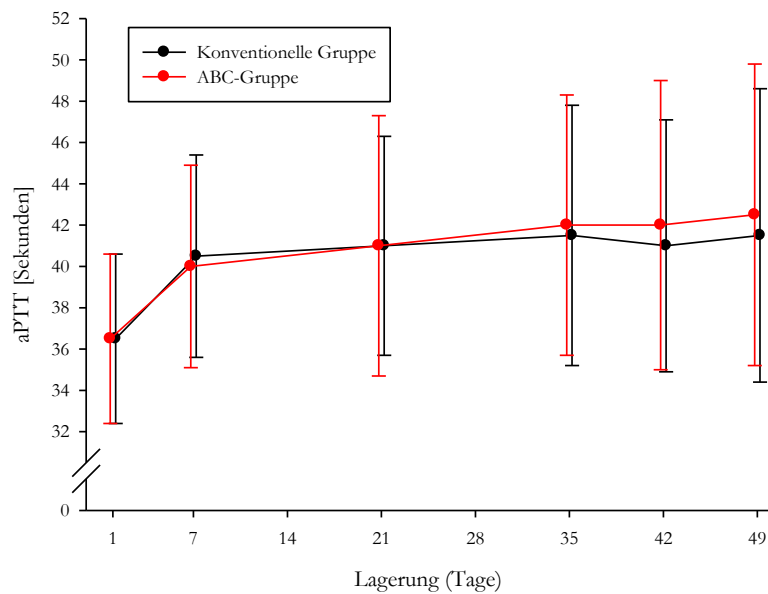


Abbildung 21: aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Sekunden über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	36,5 (4,1)	31	47	[35,0; 38,0]
7	20	40 (4,9)	31	51	[38,0; 42,0]
21	20	41 (6,3)	30	53	[38,5; 43,5]
35	20	42 (6,3)	31	54	[39,5; 44,0]
42	20	42 (7,0)	32	55	[39,5; 45,0]
49	20	42,5 (7,3)	32	56	[39,5; 45,0]

Tabelle 30: aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Sekunden, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	36,5 (4,1)	32	49	[35,0; 38,0]
7	20	40,5 (4,9)	36	55	[38,5; 42,5]
21	20	41 (5,3)	36	54	[39,0; 43,0]
35	20	41,5 (6,3)	36	54 (56)	[39,0; 44,0]
42	20	41 (6,1)	36	53 (56)	[38,5; 43,5]
49	20	41,5 (7,1)	35	52 (63)	[38,5; 44,0]

Tabelle 31: aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) in Sekunden, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. In Klammern größte Werte der Konserve Nr. 12.

4.5.1.3. Thromboplastinzeit (nach Quick)

Die Thromboplastinzeit nach Quick (PT) reduzierte sich in der ABC-Gruppe von 88,2 (SD 8,4) % am ersten Untersuchungstag auf 67,0 (SD 13,2) % am 49. Lagerungstag und in der konventionellen Gruppe von 90,7 (SD 7,7) % auf 65,1 (SD 15,4) %. Der Kurvenverlauf zeigte sich für beide Gruppen annähernd gleich. Basierend auf der AUC-Kalkulation ergaben sich Konzentrationen von 78,8 (SD 10,6) % in der ABC-Gruppe und 77,6 (SD 8,0) % in der konventionellen Gruppe ($p = 0,70$).

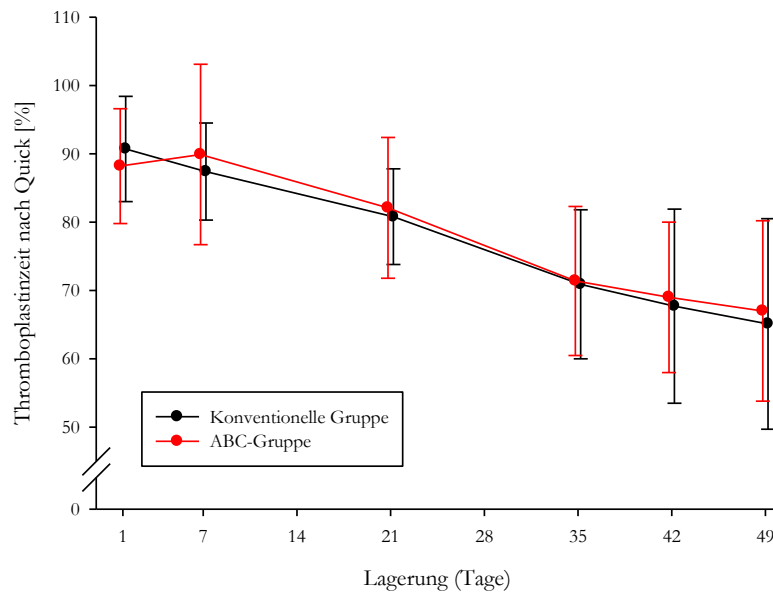


Abbildung 22: Kurvenverlauf der Thromboplastinzeit nach Quick (PT) in % über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	Konfidenz-Intervall
1	20	88,2 (8,4)	69	98	[85,0; 91,5]
7	20	89,9 (13,2)	71	125	[84,8; 95,0]
21	20	82,1 (10,3)	64	103	[78,1; 86,1]
35	20	71,4 (10,9)	53	94	[67,2; 75,6]
42	20	69,0 (11,0)	50	91	[64,7; 73,3]
49	20	67,0 (13,2)	45	92	[61,9; 72,1]

Tabelle 32: Thromboplastinzeit nach Quick (PT) in %, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	Konfidenz-Intervall
1	20	90,7 (7,7)	75	102	[87,8; 93,7]
7	20	87,4 (7,1)	73	98	[84,7; 90,2]
21	20	80,8 (7,0)	64	91	[78,1; 83,5]
35	20	70,9 (10,9)	62 (33)	89	[66,7; 75,1]
42	20	67,7 (14,2)	56 (13)	82	[62,2; 73,2]
49	20	65,1 (15,4)	58 (6)	83	[59,2; 71,1]

Tabelle 33: Thromboplastinzeit nach Quick (PT) in %, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. In Klammern kleinste Werte der Konserve Nr. 12.

4.5.2. Faktor-V-Aktivität

Der Kurvenverlauf der Faktor-V-Aktivität unterscheidet sich in beiden Untersuchungsgruppen kaum. Ausgehend von 78,9 (SD 9,7) % in der ABC-Gruppe und 80,6 (SD 9,7) % in der konventionellen Gruppe reduzierte sich die Aktivität bis zum 35. Lagerungstag auf 70,1 (SD 9,1) % (ABC-Gruppe) bzw. auf 70,5 (SD 8,3) % (konventionelle Gruppe). In der Folge stieg die Faktor-V-Aktivität in beiden Gruppen tendenziell wieder an. Am 49. Lagerungstag lag die Aktivität bei 74,7 (SD 9,5) % in der ABC-Gruppe und bei 75,1 (SD 8,0) % in der konventionellen Gruppe. Basierend auf der AUC-Prozedur ergab sich für die ABC-Gruppe eine mittlere Aktivität von 75,1 (SD 9,9) % und für die konventionelle Gruppe eine mittlere Aktivität von 75,7 (SD 8,1) % ($p = 0,83$).

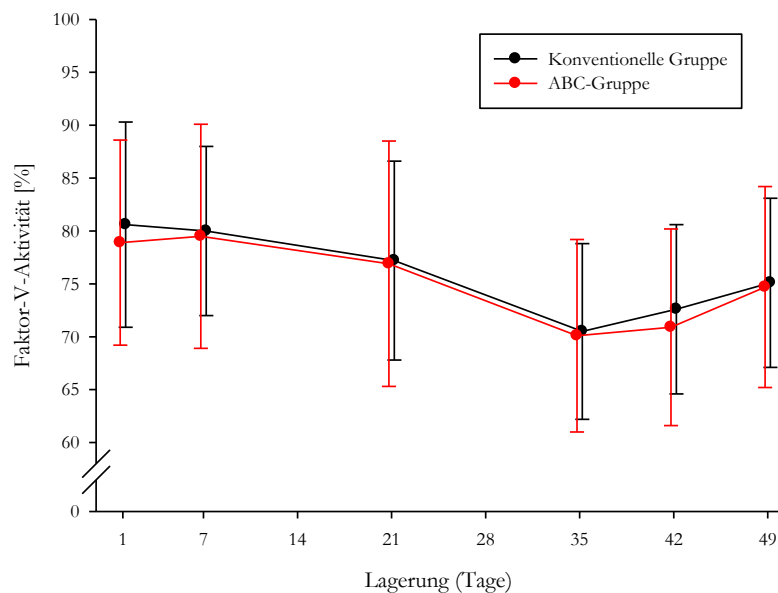


Abbildung 23: Kurvenverlauf der Faktor-V-Aktivität in % über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	78,9 (9,7)	62	102	[75,2; 82,7]
7	20	79,5 (10,6)	56	108	[75,5; 83,6]
21	20	76,9 (11,6)	59	110	[72,5; 81,4]
35	20	70,1 (9,1)	51	92	[66,6; 73,7]
42	20	70,9 (9,2)	54	91	[67,3; 74,5]
49	20	74,7 (9,5)	56	95	[71,1; 78,4]

Tabelle 34: Faktor-V-Aktivität in %, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	80,6 (9,7)	64	100	[76,9; 84,4]
7	20	80,0 (8,0)	63	93	[76,9; 83,1]
21	20	77,2 (9,4)	61	102	[73,6; 80,8]
35	20	70,5 (8,3)	54	87	[67,3; 70,7]
42	20	72,6 (8,0)	54	90	[69,5; 75,8]
49	20	75,1 (8,0)	59	96	[72,0; 78,2]

Tabelle 35: Faktor-V-Aktivität in %, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.5.3. Faktor-VIII-Aktivität

Auch der Kurvenverlauf der Faktor-VIII-Aktivität zeigte sich in den beiden Untersuchungsgruppen sehr ähnlich. In den ersten sieben Tagen der Lagerung war ein steiler Abfall zu verzeichnen. So verminderte sich die Aktivität in der ABC-Gruppe von 85,9 (SD 17,3) % am ersten Untersuchungstag um 36,3 % auf 54,7 (SD 13,7) % am siebten Lagerungstag und in der konventionellen Gruppe von 92,0 (SD 18,4) % (Tag 1) um 38,6 % auf 56,5 (SD 15,0) % (Tag 7). Im weiteren Lagerungsverlauf bis zum 42. Lagerungstag fanden sich relativ stabile Werte der Aktivität. Zum 49. Lagerungstag reduzierte sich die Faktor-VIII-Aktivität erneut stärker. Die Endaktivitäten betrugen 35,7 (SD 14,2) % in der ABC-Gruppe respektive 37,7 (SD 13,8) % in der konventionellen Gruppe.

Mittels der AUC-Prozedur fanden sich gemittelte Werte von 50,1 (SD 13,8) % in der ABC-Gruppe und 53,2 (SD 13,7) % in der konventionellen Gruppe ($p = 0,47$).

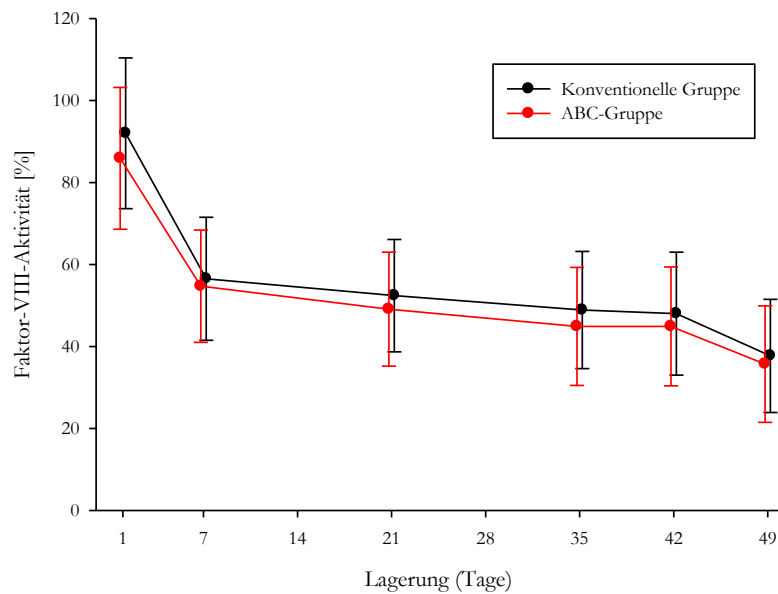


Abbildung 24: Kurvenverlauf der Faktor-VIII-Aktivität in % über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	85,9 (17,3)	54,5	112,2	[79,2; 92,6]
7	20	54,7 (13,7)	32,8	86,4	[49,4; 60,0]
21	20	49,1 (13,9)	27,6	76,9	[43,7; 54,5]
35	20	44,9 (14,4)	21,3	77,8	[39,3; 50,5]
42	20	44,9 (14,5)	26,3	80,5	[39,3; 50,5]
49	20	35,7 (14,2)	20,0	67,0	[30,2; 41,1]

Tabelle 36: Faktor-VIII-Aktivität in %, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	92,0 (18,4)	61,7	131,0	[84,9; 99,1]
7	20	56,5 (15,0)	41,2 (20,0)	83,7	[50,7; 62,3]
21	20	52,4 (13,7)	39,2 (20,0)	79,1	[47,1; 57,7]
35	20	48,9 (14,3)	29,7 (20,0)	81,2	[43,3; 54,4]
42	20	48,0 (15,0)	29,3 (20,0)	74,8	[42,2; 53,8]
49	20	37,7 (13,8)	20,0	68,3	[32,3; 43,0]

Tabelle 37: Faktor-VIII-Aktivität in %, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. In Klammern kleinste Werte der Konserve 12.

4.5.4. Fibrinogen (PT-derived)

Der initial geringere Fibrinogengehalt in der ABC-Gruppe von 2,31 (SD 0,35) g/l vs. 2,45 (SD 0,37) g/l in der konventionellen Gruppe relativierte sich bis zum 7. Lagerungstag. Die Konzentration des Fibrinogens differierte über den Untersuchungszeitraum in beiden Gruppen nur geringfügig. Am 21. Lagerungstag zeigte sich in der konventionellen Gruppe

eine leichte Reduktion auf 2,36 (SD 0,42) g/l. Am Ende der Lagerungszeit lagen die Werte in der ABC-Gruppe bei 2,46 (SD 0,34) g/l und in der konventionellen Gruppe bei 2,44 (SD 0,53) g/l. Die mittleren AUC-Werte pro Tag waren 2,40 (SD 0,34) g/l in der ABC-Gruppe bzw. 2,41 (SD 0,41) g/l in der konventionellen Gruppe ($p = 0,93$).

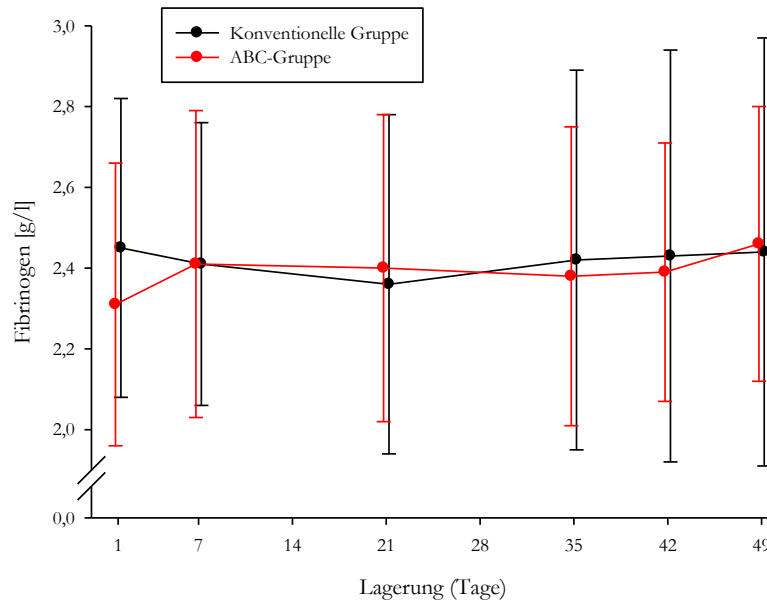


Abbildung 25: Kurvenverlauf der Fibrinogen-Konzentration in g/l über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	2,31 (0,35)	1,6	3,2	[2,18; 2,45]
7	20	2,41 (0,38)	1,5	3,0	[2,26; 2,56]
21	20	2,40 (0,38)	1,7	3,2	[2,26; 2,55]
35	20	2,38 (0,37)	1,7	3,1	[2,24; 2,52]
42	20	2,39 (0,32)	1,7	3,0	[2,27; 2,52]
49	20	2,46 (0,34)	1,8	3,0	[2,33; 2,59]

Tabelle 38: Fibrinogen in g/l, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	2,45 (0,37)	1,8	3,1	[2,30; 2,59]
7	20	2,41 (0,35)	1,9	3,2	[2,28; 2,55]
21	20	2,36 (0,42)	1,8 (1,2)	3,0	[2,20; 2,52]
35	20	2,42 (0,47)	1,8 (1,0)	3,1	[2,24; 2,60]
42	20	2,43 (0,51)	1,8 (0,9)	3,2	[2,24; 2,63]
49	20	2,44 (0,53)	1,8 (0,9)	3,3	[2,24; 2,65]

Tabelle 39: Fibrinogen in g/l, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. In Klammern kleinste Werte der Konserve 12.

4.5.5. Antithrombin-Aktivität

In beiden Untersuchungsgruppen zeigte sich ein annähernd gleicher Kurvenverlauf der Aktivität von Antithrombin (AT). Dieser ist gekennzeichnet von einem geringfügigen Abfall der AT-Aktivität bis zum 35. Lagerungstag. Am 49. Lagerungstag lag die Aktivität bei 86,2 (SD 8,6) % in der ABC-Gruppe und bei 88,4 (SD 11,0) % in der konventionellen Gruppe. Über die AUC-Prozedur errechneten sich mittlere AT-Aktivitäten von 89,8 (SD 8,9) % in der ABC-Gruppe und 92,4 (SD 10,2) % in der konventionellen Gruppe ($p = 0,39$).

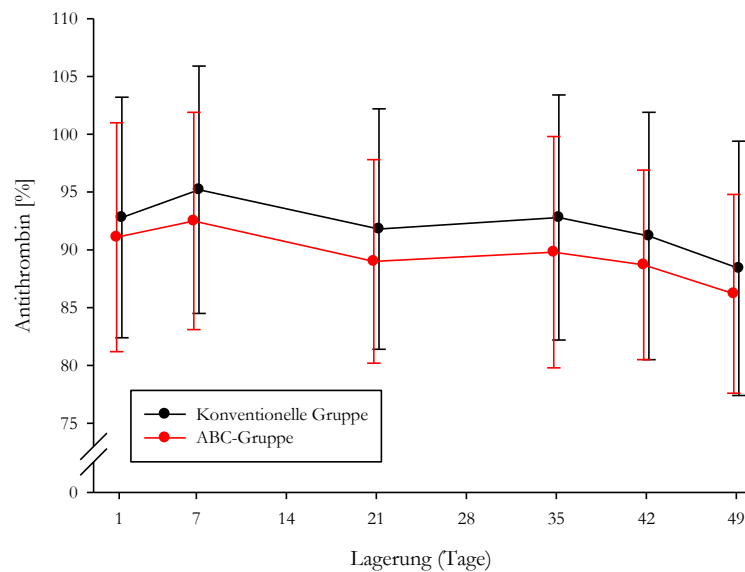


Abbildung 26: Kurvenverlauf der Antithrombin-Konzentration in % über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	91,1 (9,9)	71,2	122,5	[87,3; 95,0]
7	20	92,5 (9,4)	78,2	122,5	[88,8; 96,1]
21	20	89,0 (8,8)	75,5	117,9	[85,6; 92,4]
35	20	89,8 (10,0)	75,8	122,7	[86,0; 93,7]
42	20	88,7 (8,2)	77,3	112,9	[85,5; 91,9]
49	20	86,2 (8,6)	73,1	112,0	[82,9; 89,5]

Tabelle 40: Antithrombin-Aktivität in %, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	92,8 (10,4)	76,3	110,9	[88,8; 96,9]
7	20	95,2 (10,7)	73,4	116,7	[91,1; 99,3]
21	20	91,8 (10,4)	74,6	111,1	[87,8; 95,8]
35	20	92,8 (10,6)	75,5	108,7	[88,7; 96,9]
42	20	91,2 (10,7)	74,2	112,8	[87,1; 95,3]
49	20	88,4 (11,0)	68,8	106,9	[84,2; 92,7]

Tabelle 41: Antithrombin-Aktivität in %, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.5.6. D-Dimere

Die Konzentrationskurve der D-Dimere zeigt in beiden Gruppen einen annähernd gleichen Verlauf. Ausgehend von einer Konzentration von 222 (SD 112) $\mu\text{g/l}$ in der ABC-Gruppe und 191 (SD 91) $\mu\text{g/l}$ in der konventionellen Gruppe fand sich ein geringgradiger Anstieg der D-Dimere bis auf 252 (SD 109) $\mu\text{g/l}$ (ABC-Gruppe) und 226 (SD 78) $\mu\text{g/l}$ (konventionelle Gruppe) am 49. Lagerungstag. Die D-Dimere in den Blutkonserven der konventionellen Gruppe lagen durchgehend leicht unterhalb denen in der ABC-Gruppe, am 49. Lagerungstag betrug die Differenz genau 26 $\mu\text{g/l}$. Die kalkulierten AUC-Werte betrugen in der ABC-Gruppe 232 (SD 112) $\mu\text{g/l}$ versus 203 (SD 84) $\mu\text{g/l}$ in der konventionellen Gruppe. Es fanden sich keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,36$).

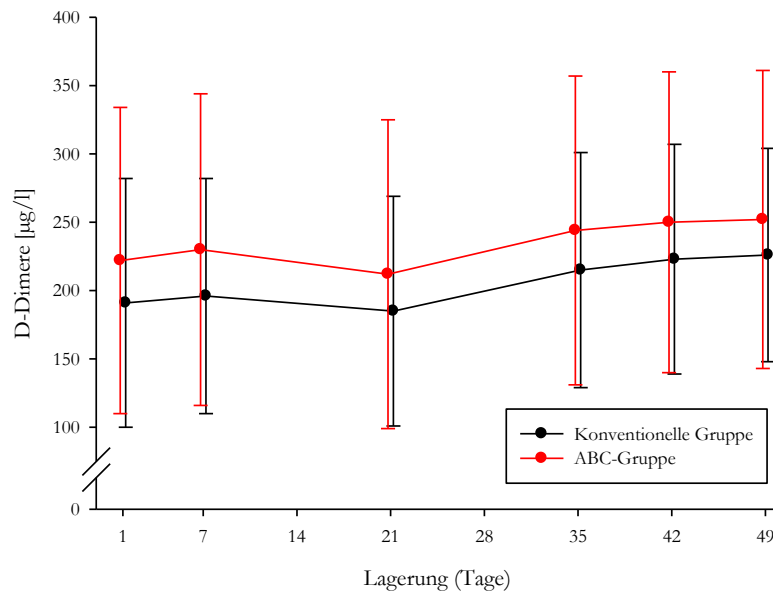


Abbildung 27: Kurvenverlauf der D-Dimere in $\mu\text{g/l}$ über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	222 (112)	86	377 (553)	[179; 265]
7	20	230 (114)	106	374 (583)	[186; 274]
21	20	212 (113)	50	357 (541)	[169; 256]
35	20	244 (113)	81	392 (571)	[200; 288]
42	20	250 (110)	110	393 (574)	[208; 293]
49	20	252 (109)	99	390 (570)	[210; 295]

Tabelle 42: D-Dimere in $\mu\text{g/l}$, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung. In Klammern größte Werte der Konserve 17.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	191 (91)	106	398	[156; 226]
7	20	196 (86)	111	410	[163; 229]
21	20	185 (84)	103	375	[153; 217]
35	20	215 (86)	107	414	[182; 248]
42	20	223 (84)	126	414	[191; 255]
49	20	226 (78)	130	410	[195; 256]

Tabelle 43: D-Dimere in $\mu\text{g/l}$, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.5.7. TAT-Komplexe

Im Lagerungsverlauf kam es weder in der ABC- noch in der konventionellen Gruppe zu einer wesentlichen Erhöhung der TAT-Komplexe. Die meisten Werte befanden sich unterhalb der Messbereichsgrenze von $2,0 \mu\text{g/l}$. Die Werte waren nicht-normalverteilt, sodass der Median, sowie der kleinste und der größte Wert angegeben werden.

Basierend auf der AUC-Prozedur ergaben sich nach dem Mann-Whitney-U-Test Konzentrationen von $2,6$ (SD $0,94$) $\mu\text{g/l}$ in der ABC-Gruppe und $2,8$ (SD $1,55$) $\mu\text{g/l}$ in der konventionellen Gruppe ($p = 0,78$).

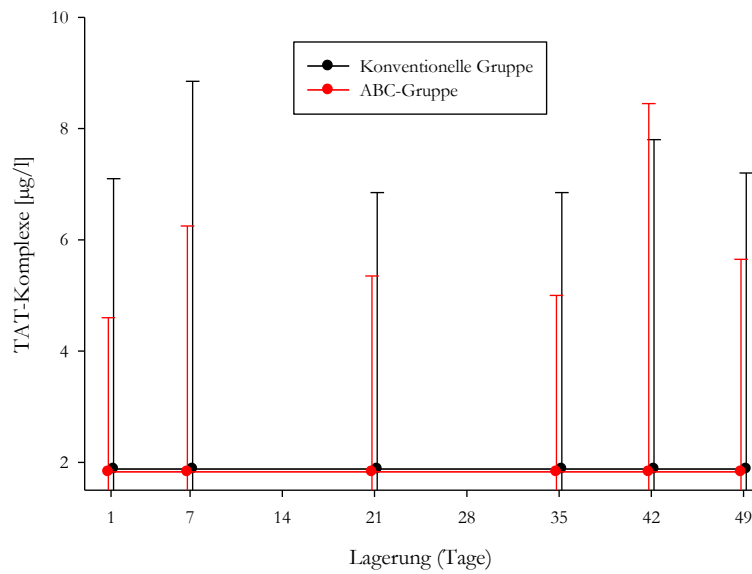


Abbildung 28: Kurvenverlauf der TAT-Komplexe in µg/l über 49 Lagerungstage, Darstellung von Median und größtem Wert.

ABC-Gruppe				
Tage	n	Median	Kleinsten Wert	Größter Wert
1	20	< 2,00	< 2,00	4,60
7	20	< 2,00	< 2,00	6,25
21	20	< 2,00	< 2,00	5,35
35	20	< 2,00	< 2,00	5,00
42	20	< 2,00	< 2,00	8,45
49	20	< 2,00	< 2,00	5,65

Tabelle 44: TAT-Komplexe in µg/l, ABC-Gruppe.

Konventionelle Gruppe				
Tage	n	Median	Kleinsten Wert	Größter Wert
1	20	< 2,00	< 2,00	7,10
7	20	< 2,00	< 2,00	8,85
21	20	< 2,00	< 2,00	6,85
35	20	< 2,00	< 2,00	6,85 (7,90)
42	20	< 2,00	< 2,00	7,80 (10,95)
49	20	< 2,00	< 2,00	7,20 (10,15)

Tabelle 45: TAT-Komplexe in µg/l, konventionelle Gruppe. In Klammern größte Werte der Konserve 12.

4.6. Rheologische Untersuchungen

4.6.1. Elongations-Index (Verformbarkeit)

Die während einer Verformbarkeitsmessung bestimmten scherabhängigen neun Elongations-Indices wurden als ein AUC-Wert zusammengefasst. Grafik und Tabelle geben die so ermittelten AUC-Werte wieder. Die Verformbarkeit der Erythrozyten verringerte sich im Laufe des Untersuchungszeitraumes. Beide Gruppen zeigten eine ungefähr gleiche Abnahme der Verformbarkeit. Die über den gesamten Zeitraum kalkulierten AUC-Werte pro Tag ergaben für die ABC-Gruppe einen Elongations-Index von 2,61 (SD 0,07) und für die konventionelle Gruppe einen Elongations-Index von 2,63 (SD 0,07). Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,44$).

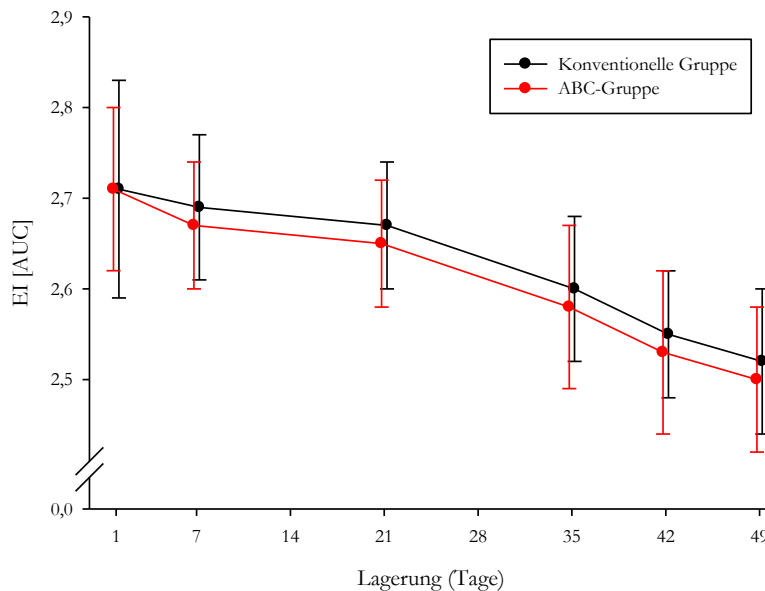


Abbildung 29: Kurvenverlauf des EI (AUC) über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	2,71 (0,09)	2,51	2,83	[2,68; 2,74]
7	20	2,67 (0,07)	2,57	2,80	[2,64; 2,70]
21	20	2,65 (0,07)	2,54	2,78	[2,63; 2,68]
35	20	2,58 (0,09)	2,43	2,71	[2,54; 2,61]
42	20	2,53 (0,09)	2,40	2,68	[2,50; 2,56]
49	20	2,50 (0,08)	2,36	2,63	[2,47; 2,53]

Tabelle 46: Elongations-Index (AUC), ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinsten Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	2,71 (0,12)	2,30	2,89	[2,66; 2,75]
7	20	2,69 (0,08)	2,50	2,82	[2,65; 2,72]
21	20	2,67 (0,07)	2,52	2,76	[2,65; 2,70]
35	20	2,60 (0,08)	2,47	2,80	[2,56; 2,63]
42	20	2,55 (0,07)	2,39	2,64	[2,52; 2,58]
49	20	2,52 (0,08)	2,34	2,63	[2,49; 2,55]

Tabelle 47: Elongations-Index (AUC), konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.6.2. Aggregations-Index (Aggregation)

Die Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten lässt sich mit dem Aggregations-Index (AI; in %) beschreiben. Der mittlere Aggregations-Index (AUC pro Tag) war mit 37,77 (SD 5,95) % in der konventionellen Gruppe höher als mit 33,52 (SD 7,57) % in der ABC-Gruppe ($p = 0,056$) und zeigte eine Tendenz zu einer erhöhten Aggregationsneigung der über das konventionelle Blutentnahmesystem gewonnenen Erythrozyten. Die Differenz zwischen den beiden Gruppen war besonders prominent in den ersten drei Lagerungswochen bis zum 21. Lagerungstag ($p = 0,03$), verminderte sich aber gegen Ende des Lagerungszeitraumes. Die Aggregationsfähigkeit reduzierte sich in beiden Gruppen. In der ABC-Gruppe dominierte eine erhöhte Streuung der Werte gegenüber den Werten der konventionellen Gruppe.

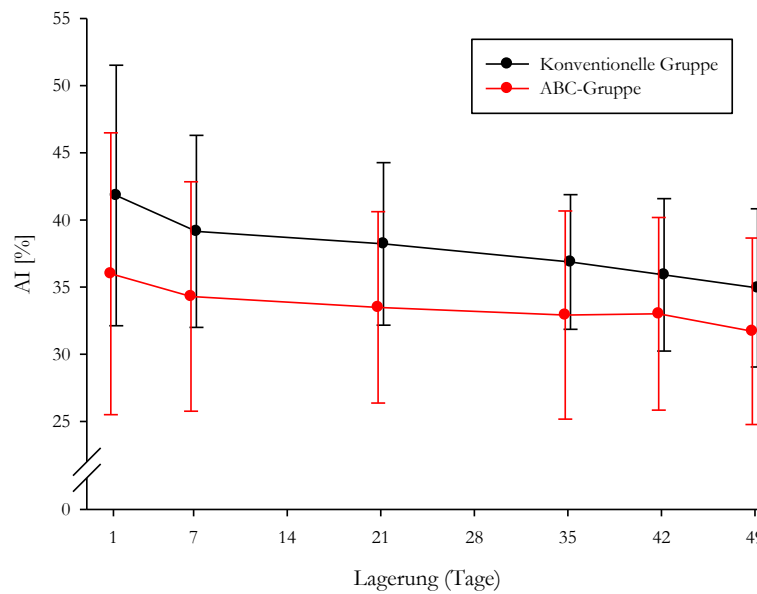


Abbildung 30: Kurvenverlauf des AI über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	35,99 (10,49)	9,24	51,11	[31,94; 40,04]
7	20	34,30 (8,54)	10,62	47,84	[31,00; 37,61]
21	20	33,49 (7,12)	14,98	44,49	[30,73; 36,24]
35	20	32,92 (7,75)	14,82	48,17	[29,92; 35,91]
42	20	33,01 (7,17)	14,54	45,98	[30,24; 35,78]
49	20	31,71 (6,94)	13,28	42,82	[29,02; 34,39]

Tabelle 48: Aggregations-Index in %, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	41,82 (9,70)	23,22	60,29	[38,07; 45,57]
7	20	39,15 (7,15)	25,11	52,78	[36,38; 41,91]
21	20	38,22 (6,05)	24,97	48,61	[35,87; 40,56]
35	20	36,87 (5,01)	26,23	46,50	[34,93; 38,81]
42	20	35,91 (5,67)	25,12	47,59	[33,72; 38,10]
49	20	34,94 (5,89)	23,36	47,23	[32,67; 37,22]

Tabelle 49: Aggregations-Index in %, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.6.3. $t_{1/2}$

Über den Wert $t_{1/2}$ lässt sich die Geschwindigkeit beschreiben, mit der sich die Erythrozyten in der schnellen Phase 3 des Syllektogrammes aggregieren (siehe „Material und Methoden“, Abschnitt „Aggregation“, Abb. 11). In Analogie zum Aggregations-Index zeigte sich auch bei $t_{1/2}$ eine ähnliche Differenz zwischen den beiden Gruppen. Die Aggregationsgeschwindigkeit nahm in der ABC-Gruppe von anfänglich 7,94 (SD 4,91) Sekunden auf

9,71 (SD 4,11) Sekunden am 49. Lagerungstag ab, in der konventionellen Gruppe reduzierte sich die Geschwindigkeit von 5,88 (SD 2,20) Sekunden am ersten Lagerungstag auf 8,08 (SD 2,26) Sekunden am letzten Lagerungstag. Die Aggregationsgeschwindigkeit war in der konventionellen Gruppe tendenziell höher ($p = 0,076$). Die AUC-Werte betrugen 8,75 (SD 4,08) Sekunden in der ABC-Gruppe und 6,91 (SD 1,75) Sekunden in der konventionellen Gruppe ($p = 0,076$). Das bei der Aggregation beschriebene Phänomen einer erhöhten Streuung der Werte in der ABC-Gruppe zeigte sich auch bei diesem Parameter.

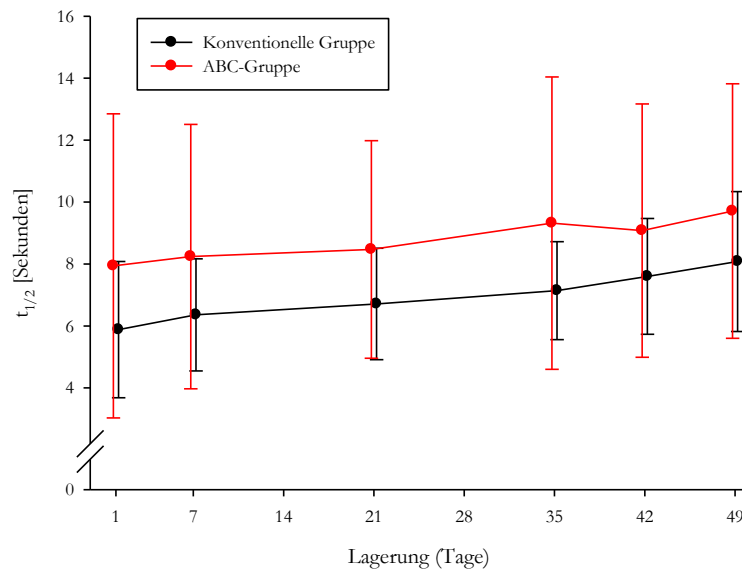


Abbildung 31: Kurvenverlauf von $t_{1/2}$ in Sekunden über 49 Lagerungstage.

ABC-Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	7,94 (4,91)	3,76	26,25	[6,04; 9,84]
7	20	8,24 (4,27)	4,32	24,43	[6,59; 9,89]
21	20	8,47 (3,51)	4,95	21,14	[7,11; 9,83]
35	20	9,32 (4,72)	4,19	26,61	[7,49; 11,15]
42	20	9,08 (4,09)	4,63	23,75	[7,50; 10,66]
49	20	9,71 (4,11)	5,43	24,04	[8,12; 11,29]

Tabelle 50: $t_{1/2}$ in Sekunden, ABC-Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Konventionelle Gruppe					
Tage	n	MW (SD)	Kleinster Wert	Größter Wert	95%-Konfidenz-Intervall
1	20	5,88 (2,20)	2,58	11,77	[5,03; 6,73]
7	20	6,36 (1,81)	3,48	11,21	[5,66; 7,06]
21	20	6,71 (1,80)	4,19	11,89	[6,01; 7,41]
35	20	7,14 (1,58)	4,46	11,19	[6,53; 7,75]
42	20	7,60 (1,87)	4,35	11,55	[6,88; 8,33]
49	20	8,08 (2,26)	4,32	13,72	[7,21; 8,95]

Tabelle 51: $t_{1/2}$ in Sekunden, konventionelle Gruppe; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

4.7. Übersicht Lagerungsparameter

Lagerungsparameter	Einheiten	ABC-Gruppe	Konventionelle Gruppe	p-Wert
pH-Wert	(bei 22°C)	6,94 (0,04)	6,95 (0,04)	0,48
Glukose	mg/dl	305,8 (30,4)	291,4 (46,4)	0,26 (0,07*)
Laktat	mmol/l	15,6 (1,6)	15,4 (1,4)	0,69
ATP	µmol/g Hb	3,11 (0,40)	3,05 (0,36)	0,61
2,3-DPG	µmol/g Hb	0,54 (0,25)	0,54 (0,20)	0,99
Freies Hämoglobin	g/Konserve	0,29 (0,08)	0,30 (0,12)	0,71 (0,04*)
Hämolyserate	%	0,28 (0,08)	0,28 (0,11)	0,93
Kalium	mmol/Konserve	6,55 (0,66)	6,55 (1,07)	0,99 (0,04*)
Plasmatische Koagulationsparameter				
Thrombinzeit (TT)	Sekunden	21,6 (1,4)	21,9 (3,7)	0,76
Thromboplastinzeit nach Quick (PT)	%	78,8 (10,6)	77,6 (8,0)	0,70
Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	Sekunden	40,9 (5,8)	40,7 (5,4)	0,90
Faktor-V-Aktivität	%	75,1 (9,9)	75,7 (8,1)	0,83
Faktor-VIII-Aktivität	%	50,1 (13,8)	53,2 (13,7)	0,47
Fibrinogen (PT-derived)	g/l	2,40 (0,34)	2,41 (0,41)	0,93
Antithrombin	%	89,8 (8,9)	92,4 (10,2)	0,39
D-Dimere	µg/l	232 (112)	203 (84)	0,36
TAT-Komplexe	µg/l	2,6 (0,94)	2,8 (1,55)	0,78 †
Rheologische Parameter				
Elongations-Index		2,61 (0,07)	2,63 (0,07)	0,44
Aggregations-Index	%	33,52 (7,57)	37,77 (5,95)	0,056
t _{1/2}	Sekunden	8,75 (4,08)	6,91 (1,75)	0,076

Tabelle 52: Übersicht Lagerungsparameter. Daten sind als AUC-Werte (Standardabweichung) angegeben. * F-Test für die Gleichheit der Varianzen, † Mann-Whitney U-Test für nicht normalverteilte Daten.

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen einer neuartigen Blutsammlungstechnik auf die Qualität von Vollblutkonserven während der Blutlagerung untersucht. Das Vollblut wurde während der Blutsammlung kontinuierlich mit der Antikoagulanzlösung zusammengebracht. Die Ergebnisse des mit der neuartigen Blutentnahmetechnik untersuchten Blutes wurden in der „ABC-Gruppe“ (ABC®-Waage, Automated Blood Collection) zusammengefasst, die Ergebnisse der konventionellen Blutentnahmetechnik in der „konventionellen Gruppe“. Sofern auf die vorliegende Studie Bezug genommen wird, wird diese als „ABC-Studie“ bezeichnet.

5.1. Vollblutspende

In den entwickelten Industrienationen hat die Blutkomponentenspende die Vollblutspende größtenteils abgelöst (231, 280). Der Übergang von Vollbluttransfusionen zur Komponententherapie erfolgte in den 1970er und 1980er Jahren (398). Bei der Blutkomponentenspende wird das gewonnene Vollblut in seine einzelnen Komponenten Erythrozyten, Plasma und Thrombozyten aufgeteilt. Mit diesen einzelnen Komponenten lässt sich gezielt ein Mangelzustand des Empfängers behandeln. Die einzelnen Blutprodukte lassen sich so ökonomischer einsetzen. Je nach Bedarf werden bestimmte Komponenten verabreicht (257). Ökonomisch vorteilhaft erweist sich zudem, dass einige Blutkomponenten länger lagerbar sind als andere, wie z. B. die Lagerung von Gerinnungsfaktoren als Kryokonservate (Gefrierkonservate).

In Entwicklungsländern hingegen haben die Vollblutspende und Vollbluttransfusion weiterhin einen größeren Stellenwert (115, 262, 275). Die Gewinnung von Blutprodukten über die Blutkomponentenspende und die Auf- und Weiterverarbeitung setzt das Vorhandensein entsprechend ausgestatteter Laboratorien voraus. Dieses ist in zahlreichen Entwicklungsländern nicht gewährleistet. In entlegenen Landstrichen z. B. erfolgt die Blutspende als Vollblutspende v. a. aus logistischen Gründen in mobilen Spendeeinrichtungen.

Ebenfalls bleibt die Vollblutspende weiterhin für die autologe präoperative Eigenblutspende gerechtfertigt und erlaubt (71, 160). Nach den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ der

Bundesärztekammer ist bei Lagerung als Vollblut eine Leukozytendepletion durchzuführen (71). Mit der Eigenblutspende minimieren die Empfänger das Risiko, über die Transfusion von allogenen Blutprodukten mit pathogenen, infektiösen Erregern infiziert zu werden. Eine präoperative autologe Blutspende reduziert den Bedarf an allogenen Blutprodukten (66).

Vollblutspenden sind mit einigen Vorteilen gegenüber der Komponententherapie verbunden. So reduziert sich durch die Verabreichung von Vollblut die Exposition gegenüber Blutprodukten von vielen verschiedenen Spendern (209, 280, 398). Durch Verwendung von Vollblut vermindert sich ebenfalls die Menge bzw. das Volumen an transfundierten Blutprodukten (257, 398).

In einigen Studien ergaben sich Hinweise, dass im klinischen Zustand einer massiven Hämorrhagie, im schweren hämorrhagischen Schock als auch bei einer Koagulopathie die Verabreichung von Vollblut gegenüber der Verabreichung von Blutkomponenten überlegen sein könnte (257, 338, 398). Hämorrhagie, Schock und Koagulopathie stehen insbesondere mit Massivtransfusionen in Zusammenhang. Als massive Bluttransfusionen bezeichnet man die Verabreichung von mehr als zehn Einheiten innerhalb von 24 Stunden. Im zivilen Bereich ist dieses bei 3 bis 5 % aller Traumata der Fall. Im militärischen Bereich, bezogen auf die US-Streitkräfte, liegt die Verabreichung von Massivtransfusionen bei 10 % (257).

Gerade im militärischen Bereich besteht in jüngerer Zeit wieder ein vermehrtes Interesse an der Verwendung von Vollblut (257, 338), wobei insbesondere der Vorteil von frischem Vollblut hervorgehoben wird. Historisch gesehen wurden im Irak- und Afghanistan-Krieg mehr als 6000 Einheiten Vollblutkonserven transfundiert. Im Vietnamkrieg waren es mehr als 800.000 Einheiten (257). Dabei betrug die durchschnittliche Lagerungszeit des im Vietnamkrieg verabreichten Vollblutes sieben Tage (398). In einer von Friesen et al. durchgeführten Studie bei pädiatrischen Patienten, welche sich einer koronaren Bypass-Operation unterziehen mussten, zeigten sich höhere Konzentrationen von Fibrinogen, höhere Thrombozytenzahlen und verbesserte Gerinnungszeiten im Empfängerorganismus nach Transfusion von frischem Vollblut als nach Verabreichung von Blutkomponenten (139). Aktuell wird an der Mayo-Klinik in Rochester, MN, USA eine Studie zur Verwendung von Vollblut bei massiver Hämorrhagie durchgeführt (398).

Einer der Vorteile von Vollblut gegenüber Erythrozytenkonzentraten besteht hauptsächlich darin, dass im Vollblut die Koagulationsfaktoren zum großen Teil erhalten bleiben. Die Verwendung von Vollblut gegenüber einer Komponententherapie im Rahmen bestimmter operativer Eingriffe, scheint auf das klinische Resultat keinen negativen Einfluss zu haben und führt dabei zu einer signifikanten Verminderung der Exposition gegenüber Blutprodukten von vielen verschiedenen Spendern (209).

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass die Blutsammlung mit der ABC[®]-MacoPharma-Waage gegenüber der konventionellen Sammelmethode eine geringere Standardabweichung des Sammelvolumens und eine geringere Standardabweichung des durch den Leukozytenfiltrationsprozess verursachten Volumenverlustes ergab. Zudem tendierte der Hb-Gehalt in der konventionellen Gruppe zu einer höheren Variation. Daraus lässt sich schließen, dass die ABC[®]-MacoPharma-Waage eine bessere Standardisierung der gewonnenen Blutkonserven liefert. Ebenfalls eine geringere Standardabweichung des Sammelvolumens von mit der ABC[®]-MacoPharma-Waage gewonnenem Vollblut konnten Fontana et al. beobachten. Fontana et al. registrierten eine höhere Kontamination mit Leukozyten in dem mit der ABC[®]-MacoPharma-Waage gewonnenem Blut, dieses zeigte sich in der vorliegenden ABC-Studie nicht (133).

Ein großer Vorteil der ABC[®]-Waage liegt darin, dass durch das kontinuierliche Hinzufügen der Antikoagulanzlösung zum gesammelten Blut das Blutsammelvolumen an den Hkt des Spenders angepasst werden kann, um so ggf. ein geringeres Volumen zu gewinnen (172). Nichterreichen des Zielsammelvolumens von ungefähr 450 ml bei der konventionellen Blutsammlung führt zu einem höheren Verhältnis von Antikoagulanzlösung zum gesammelten Blutvolumen, was höhere Konzentrationen von freiem Hb und K⁺ in den gelagerten Blutkonserven bedingt (85).

5.2. Leukozytenreduktion

Leukozyten beeinflussen die Qualität der gelagerten Blutprodukte, sind für Transfusionsreaktionen mitverantwortlich, sind potentielle Träger pathogener Keime und können eine HLA-Alloimmunisierung bedingen (302).

Da Leukozyten kontinuierlich Glukose konsumieren, vermindern sie so den Energievorrat im Lagermedium und produzieren Laktat. Das Abfiltern der Leukozyten während oder nach der Blutsammlung, die sogenannte Leukozytendepletion, führt zu einer besseren

Bewahrung von Glukose und ATP sowie zu einem geringeren Anstieg von Laktat (83, 280). Mit einer Leukozytendepletion zeigte sich in verschiedenen Studien neben einer verminderten Hämolyse (149, 156, 167, 168, 280, 302, 400), eine verminderte K^+ -Freisetzung (149) und ein geringerer Membranproteinverlust über Absonderung von Vesikeln (149). Des Weiteren findet sich nach Leukozytendepletion ein besseres Überleben der transfundierten Erythrozyten im Empfängerorganismus (280, 400), eine verminderte Adhäsion der Erythrozyten an kultivierte Endothelzellen (229, 400) sowie eine bessere Perfusion der mikrozirkulatorischen Gefäße (110). Labile plasmatische Koagulationsfaktoren erfahren durch die Leukozytendepletion eine deutlich bessere Bewahrung (280, 302, 326, 367).

Leukozyten sezernieren bioreaktive Substanzen in das Lagerungsmedium. Hierzu gehören die Enzyme Elastase, Collagenase, Cathepsin G (83, 149) und sie aktivieren Cytokine (400) und Chemokine über die Freisetzung von extrazellulären Vesikeln (102). Bei ihrer Degeneration setzten Leukozyten Eicosanoide (83, 149) und Phospholipase-A2 frei. Phospholipase-A2 baut Phospholipide ab, was zu der Bildung von Lysophospholipiden führt (400). Auch findet sich bei nicht-leukozytendepletiertem Blut ein Anstieg von Histamin, Interleukin-1-beta (IL-1 β), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor α (TNF α). TNF α und IL-8 können Neutrophile aktivieren. Einige der freigesetzten Substanzen führen zur Bildung toxischer O_2 -Spezies, welche möglicherweise für die verstärkte Hämolyse sowie den K^+ -Verlust aus den Zellen verantwortlich sind. TNF α , IL-8 und IL-1 β können im Empfängerorganismus die Freisetzung von Cytokinen stimulieren, welche vermutlich zu febrilen Transfusionsreaktionen mit beitragen (83, 149).

Mit einer Leukozytendepletion kann demnach nicht nur das Risiko für die Übertragung von Infektionen wie CMV (159, 302) als auch die Gefahr einer bakteriellen Kontamination (69) vermindert werden, sondern die Qualität des Blutproduktes deutlich gesteigert werden. So ist die Qualität von leukozytendepletiertem Vollblut in vielen Faktoren den Blutkomponenten ebenbürtig.

Mit dem Filtrationsprozess werden zudem 90 bis 99 % der Thrombozyten in den Filtern zurückgehalten (280, 302).

Nach den derzeitigen Vorgaben müssen mit der Filtration die Leukozyten auf einen verbleibenden Restgehalt von weniger als 10^6 Leukozyten minimiert werden (120). Dieser Zielwert wurde in der ABC-Studie in beiden Untersuchungsgruppen nicht überschritten.

5.3. Metabolismus

5.3.1. pH-Wert

Physiologisch liegt der pH-Wert des humanen Blutes in einem Bereich zwischen 7,36 und 7,44 (111). Während der Spende wird das Blut mit der relativ aciden CPDA-1-Lösung (pH 5,6 bis 5,8) zusammengebracht. Der initial geringgradig erniedrigte pH-Wert von 7,31 in beiden Gruppen der ABC-Studie ist auf das Zusammenfügen von Spenderblut und CPDA-1 zurückzuführen (166). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Applikationsverfahren. Sowohl die Vermischung in der Konserve im konventionellen Sammelssystem als auch die kontinuierliche Zuführung von CPDA-1 zum gesammelten Blut in der ABC-Gruppe führten zu keinem signifikant unterschiedlichen Effekt auf den pH-Wert.

Im Verlauf der Lagerungszeit kam es zu einer fortwährenden Verminderung des pH-Wertes. Dieses ist v. a. durch den kontinuierlichen Konzentrationsanstieg von Laktat als Endprodukt der anaeroben Glykolyse bedingt (165, 167, 200, 297). Zwischen dem 35. und dem 49. Lagerungstag zeigte sich in beiden Gruppen eine im Vergleich mit den ersten drei Lagerungswochen geringere Abnahme des pH-Wertes. In diesem Zeitraum ab der fünften Lagerungswoche ließ sich auch eine geringere Zunahme des Laktates beobachten.

Neben der Zunahme der Laktatkonzentration fallen während der Lagerung u. a. durch oxidative Prozesse fortlaufend Protonen an, die ebenfalls zu einer Reduzierung des pH-Wertes beitragen (165, 166, 400).

Viele metabolische Prozesse der Erythrozyten sind vom pH-Wert abhängig. Geschwindigkeitsbestimmend für die Glykolyse sind die Aktivitäten der Enzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase. Diese Enzyme haben ein relativ hohes pH-Optimum, bei einem pH-Wert unter 7,0 zeigen beide nur eine geringe Aktivität. D. h., dass bei einem niedrigeren pH-Wert die Glykolyse verlangsamt abläuft (54). Bei einem pH-Wert unter 6,2 (bei 37° C) kommt es zu einem vollständigen Erliegen der Glykolyse (167).

Zudem sind sämtliche chemische Reaktionen, die Aktivität der Enzyme und die Aktivität der Transportproteine der Membran, bei Lagerungstemperaturen von 4° C verringert. Ein leicht acider pH-Wert und eine erniedrigte Lagerungstemperatur stellen sich für den Ablauf des Glukosemetabolismus durchaus günstig dar, da zum einen weniger Glukose metabolisiert wird, zum anderen weniger Laktat anfällt. Durchschnittlich reduziert sich der pH-Wert von bei 4° C gekühlt gelagerten Blutes um 0,1 pro Woche. Sofern Blutkonserven

bei Raumtemperatur gelagert wurden, ließ sich bereits innerhalb von 16 Stunden eine Reduktion des pH-Wertes um 0,1 beobachten (166).

Am Ende der 49-tägigen Blutlagerung lagen die pH-Werte in der ABC-Gruppe bei 6,73 (SD 0,05) und in der konventionellen Gruppe bei 6,76 (SD 0,05). Im Durchschnitt haben die verwendeten Bluttransfusionseinheiten in den Vereinigten Staaten von Amerika und der Europäischen Union einen pH-Wert von 6,5 (165).

Nach der Transfusion gelagerter Blutkonserven können pH-Werte in einem stark sauren Bereich zu Zellschädigungen führen. Ein niedriger pH beansprucht die Pufferkapazität des Blutes. Der niedrige pH-Wert einzelner Transfusionseinheiten wird normalerweise durch die Pufferkapazität des Blutes im Empfängerorganismus gut abgefangen. Bei Massivtransfusionen kann es durch den sauren pH-Wert zu einem pH-Abfall im Empfängerorganismus kommen (355).

Acide pH-Werte begünstigen die Protonierung negativ geladener Membranskelettproteine. Diese Protonierung steht im Zusammenhang mit einer Einschränkung der Verformbarkeit des Membranskelettes (24). Zudem ist die Morphologie der Erythrozyten vom pH-Wert abhängig, dieses macht sich jedoch nur bei pH-Werten unter 6,4 und über 7,7 bemerkbar (187).

5.3.2. Glukose und Laktat

Glukose wird von den Erythrozyten zur Energiegewinnung benötigt. Der Erythrozyt verfügt über drei Stoffwechselwege, über welche ATP, NADH und 2,3-DPG generiert werden. Zum Ablauf der Glykolyse sei hier auf die „Einleitung“, Kapitel „Metabolismus“ verwiesen.

In der ABC-Gruppe und in der konventionellen Gruppe kam es mit voranschreitender Lagerungszeit zu einer kontinuierlichen Abnahme der Glukosekonzentration, wobei sich eine Tendenz zu einer höheren Variation in der konventionellen Gruppe zeigte. Verglichen mit anderen Untersuchungsgruppen fanden sich ähnliche Glukosespiegel am 42. Lagerungstag bei leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten (133) und am 49. Lagerungstag bei leukozytendepletiertem und in CPDA-1 gelagertem Vollblut (368). Bei v. Bormann et al. lag die Glukosekonzentration an Tag 49 bei 194 (SD 29) mg/dl (368). Da es sich bei den Transfusionseinheiten um geschlossene Systeme handelt, können während der Lagerungszeit weder weitere Energiequellen zugeführt werden, noch können

Stoffwechselabbauprodukte abtransportiert werden, wie es unter physiologischen Bedingungen im Organismus unproblematisch erfolgt. Aufgrund der kontinuierlichen Verstoffwechselung von Glukose nimmt deren Konzentration ab, während die Konzentration von Laktat in den Transfusionseinheiten fortlaufend ansteigt (191). Die Laktatkonzentration lag mit 27,2 (SD 2,2) mmol/l am 49. Lagerungstag bei v. Bormann (367) höher als in der vorliegenden Studie, bei Fontana et al. betrug sie am 42. Lagerungstag bei leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten bereits 32,23 (SD 3,74) mmol/l. Letztere Gruppe verwendete ebenfalls die ABC[®]-Waage (133).

In beiden Untersuchungsgruppen zeigte sich ab dem 35. Lagerungstag ein langsamerer Abfall der Glukosekonzentration im Vergleich zu den ersten drei Lagerungswochen. Dieses erklärt den geringeren Anstieg der Laktatkonzentration ab dem 35. Lagerungstag im Vergleich zu den Messwerten bis Tag 21. Die Tendenz zu einer erhöhten Variation der Glukosekonzentration in der konventionellen Gruppe fand sich in Bezug auf die Laktatkonzentration nicht.

Bei niedrigen pH-Werten unter 7,0 und einer Lagerungstemperatur um 4° C läuft die Glykolyse verlangsamt ab. Der Vorteil besteht in einer geringeren Konsumierung von Glukose und einer verminderten Produktion von Laktat. Jedoch wird so auch weniger ATP, 2,3-DPG, NADH und NADPH gebildet. Näheres zu dem Zusammenhang zwischen der Glykolyse und dem pH-Wert findet sich im Kapitel „pH-Wert“.

Auf der anderen Seite gibt es Faktoren, die zu beschleunigten Stoffwechselprozessen führen können. An das Protein Bande 3 sind die glykolytischen Enzyme Phosphofruktokinase, Aldolase und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gebunden. Durch diese Komplexbindung werden die glykolytischen Enzyme inhibiert. Die zytoplasmatische Domäne von Protein Bande 3 kann Bindungen mit Hb eingehen. Oxidativer Stress, welcher während der Lagerung anfällt, begünstigt eine Bindung von Hb mit Protein Bande 3. Zudem hat desoxygeniertes Hb (T-Konformation des Hb) eine hohe Affinität zu Protein Bande 3. Bei Bindung von Desoxy-Hb mit Protein Bande 3 kommt es zu einer Dissoziation der glykolytischen Enzyme vom Hb. In der Folge wird die Geschwindigkeit der Glykolyse erhöht (65, 73). Ebenfalls führt eine Tyrosin-Phosphorylierung von Protein Bande 3 zu einer reversiblen Dissoziation der glykolytischen Enzyme. Während der Lagerungszeit kommt es zudem zu einem progredienten Verlust von Protein Bande 3. Durch die Verminderung der Komplexbindungsmöglichkeiten der

glykolytischen Enzyme führt dieses ebenfalls zu einer beschleunigten glykolytischen Aktivität (349).

5.3.3. ATP

Das über die Glykolyse gewonnene ATP wird von den Erythrozyten als Energieträger für zahlreiche Prozesse benötigt. Zum einen sind die aktiven Kationentransporter der Zellmembran auf ATP angewiesen. Hierzu zählen verschiedene ATP-abhängige Transporter wie die Na^+/K^+ -ATPase und die Ca^{2+} -ATPase. ATP wird weiter benötigt, um das Eisen des Hb in der bivalenten Form (Fe^{2+}) zu bewahren, sowie um die Sulfhydrylgruppen von Enzymen, Hb und Membranproteinen in einer aktiven und reduzierten Form zu halten (54). Translokasen (Flippase und Floppase) sind zur Aufrechterhaltung der asymmetrischen Phospholipidverteilung in der Lipiddoppelschicht auf den Energieträger ATP angewiesen (siehe „Einleitung“, Kapitel „Lipiddoppelschicht“). ATP ist vermutlich in die Regulation des Gefäßtonus eingebunden und kann von den Erythrozyten als Reaktion auf Veränderungen der Hb- O_2 -Sättigung, des pO_2 , auf Scherung und Verformung freigesetzt werden (4, 117, 134, 227) (siehe Kapitel „NO und ATP“). Kontrovers wird ein potentieller Zusammenhang zwischen dem ATP-Gehalt der Zellen und der bikonkaven Form der Erythrozyten, ihrer Verformbarkeit als auch dem Überleben der Erythrozyten nach der Transfusion im Empfängerorganismus diskutiert (54, 297) (siehe Kapitel „Verformbarkeit und Formveränderungen der Erythrozyten“ sowie „Post-transfusionsüberleben“).

Über den Lagerungszeitraum zeigte sich in beiden Gruppen eine Abnahme der ATP-Konzentration. Dieses ist durch den sich reduzierenden Glukosevorrat in den Transfusionseinheiten und durch den fortlaufenden Verbrauch von ATP bedingt. Daneben wird der Konzentrationsverlauf des ATPs im Lagermedium vom pH-Wert und der Temperatur, sowie von Veränderungen des Proteins Bande 3 beeinflusst. Die Reduktion des ATP-Gehaltes der Erythrozyten während der Lagerungszeit ist im Rahmen des „Lagerungsschadens“ bekannt (4, 360, 391).

Die Aktivität der Phosphoglyceratkinase hat ihr Optimum bei einem pH-Bereich zwischen 7,04 und 7,2. So kommt es einhergehend mit Abnahme des pH-Wertes mit dem siebten Lagerungstag von 7,31 (SD 0,11) auf 7,17 (SD 0,06) in der konventionellen Gruppe und

von 7,31 (SD 0,12) auf 7,16 (SD 0,09) in der ABC-Gruppe, d. h. mit Abfall des pH-Wertes unter 7,2 in beiden Gruppen zunächst zu einer vermehrten Produktion von ATP mit Anstieg der ATP-Konzentration. Mit weiterem Abfall des pH-Wertes im Lagerungsverlauf unter 7,0, sich reduzierendem Glukoseangebot und fortlaufendem ATP-Verbrauch war eine kontinuierliche Abnahme des ATP-Gehaltes einhergehend.

Die Ergebnisse bestätigten Messwerte anderer Gruppen. Die Gruppen von Picker et al. und v. Bormann et al. registrierten in leukozytendepletiertem CPDA-1-Vollblut einen Anstieg der ATP-Konzentration mit dem 7. Messungstag. Am 49. Lagerungstag lag die ATP-Konzentration bei Picker et al. bei 1,6 (SD 0,4) $\mu\text{mol/g Hb}$ (280) und bei v. Bormann et al. bei 2,4 (SD 0,3) $\mu\text{mol/g Hb}$ (367).

5.3.4. 2,3-DPG

Während der Lagerungszeit kam es in beiden Gruppen relativ rasch zu einer fast kompletten Depletion von 2,3-DPG. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Untersuchungsgruppen überein (4, 74, 167, 270, 360).

2,3-DPG wird im Rapoport-Luebering-Shunt aus 1,3-DPG durch die 2,3-Diphosphoglyceratmutase (Diphosphoglyceratsynthase) katalysiert. Als Mutase hat dieses Enzym sein pH-Optimum bei 7,2. Sinkt der pH-Wert unterhalb von 7,2, kommt es zu einem Überwiegen der Aktivität der Diphosphoglyceratphosphatase und deshalb zu einer vermehrten Bildung von 3-Phosphoglycerat aus 2,3-DPG. Zudem stimulieren H^+ -Ionen, d. h. ein niedriger pH-Wert, die Phosphatase und inhibieren die Mutase. Die Aktivität der 2,3-Diphosphoglyceratmutase kommt unterhalb eines pH-Wertes von 6,9 praktisch komplett zum Erliegen (296). 3-Phosphoglycerat wird im Emden-Meyerhof-Weg unter Gewinnung von ATP weiter zu Laktat metabolisiert (54, 167, 199, 225).

Am 7. Lagerungstag lag der pH-Wert in der konventionellen Gruppe bei 7,17 (SD 0,06) und in der ABC-Gruppe bei 7,16 (SD 0,09). Dieses erklärt, dass sich die 2,3-DPG-Konzentration in der ersten Lagerungswoche in beiden Gruppen bereits nahezu halbiert hatte. In der konventionellen Gruppe von initial 15,2 (SD 14,45) auf 8,1 (SD 3,12) $\mu\text{mol/g Hb}$ und in der ABC-Gruppe von initial 17,4 (SD 20,87) auf 7,84 (SD 2,48) $\mu\text{mol/g Hb}$. Die leichte, nicht signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen ist am ehesten auf den gering niedrigeren pH-Wert in der ABC-Gruppe zurückzuführen.

Mit im Verlauf der Lagerungszeit weiter abfallendem pH-Wert und sich insgesamt reduzierendem Angebot an Glukose, kam es mit dem 21. Lagerungstag in beiden Gruppen

zu einer nahezu vollständigen Depletion von 2,3-DPG, sodass mit dem 42. Lagerungstag die 2,3-DPG-Bestimmungen vorzeitig beendet wurden. Die über den Rest der Lagerungszeit noch vorhandenen 2,3-DPG-Spiegel waren höchstwahrscheinlich auf Messungenauigkeiten des verwendeten Testkits zurückzuführen.

2,3-DPG stabilisiert den T-Status des Hb (desoxygeniertes Hb) und erleichtert dadurch die O₂-Dissoziation vom Hb. Die Folge einer verminderten 2,3-DPG-Konzentration der Erythrozyten ist eine Linksverschiebung der O₂-Dissoziationskurve mit einer hohen Affinität des Hb gegenüber O₂. Dadurch ist die O₂-Aufnahme in der Lunge erleichtert, die Dissoziation des O₂ vom Hb in den Geweben der Peripherie jedoch erschwert (47, 48, 225, 294, 352) (siehe „Einleitung“, Kapitel „Hämoglobin und Sauerstoffbeladung“).

Als Konsequenz der niedrigen 2,3-DPG-Konzentrationen werden die Erythrozyten des zu transfundierenden Vollblutes zunächst eine verminderte O₂-Abgabe an die Gewebe aufweisen.

Nach erfolgter Transfusion kommt es jedoch relativ rasch zu einer de novo Synthese von 2,3-DPG (155, 200). Innerhalb von sieben Stunden post transfusionem werden ungefähr 50 % der normalen 2,3-DPG-Konzentrationen wiederhergestellt, innerhalb von 72 Stunden sind im Durchschnitt die physiologischen Konzentrationen von 2,3-DPG so gut wie vollständig wiedererlangt (55, 155, 200).

Auch wenn es relativ schnell zu einer Wiederherstellung physiologischer 2,3-DPG-Konzentrationen kommt, besteht insbesondere innerhalb der ersten 24 Stunden nach erfolgter Transfusion eine eingeschränkte O₂-Abgabe der transfundierten Erythrozyten an die Gewebe (349). Dabei soll mit einer Bluttransfusion eine ausreichende O₂-Versorgung der Gewebe gewährleistet bzw. wiederhergestellt werden. Die erschwerte und verminderte O₂-Diffusion beantwortet der Organismus mit einer Steigerung des Herzzeitvolumens (HZV). Die so induzierte kardiovaskuläre Belastung kann ein Risiko für kardial vorgeschädigte Empfänger (z. B. bei Herzinsuffizienz, Lungenödem) darstellen.

Auf der anderen Seite bestehen möglicherweise Vorteile in einer Linksverschiebung der O₂-Dissoziationskurve. Normalerweise diffundiert O₂ entlang seiner Flussstrecken kontinuierlich von den Erythrozyten in die Gewebe (305). Aufgrund des durch den 2,3-DPG-Mangel induzierten niedrigen p50 kann O₂ direkt in anoxische Regionen transportiert werden, welche ansonsten vermutlich nicht ausreichend O₂ erhalten würden.

Möglicherweise besteht mit einer künstlich induzierten Linksverschiebung der O₂-Dissoziationskurve eine Therapieoption zur O₂-Versorgung anoxischer Gewebe (352, 355, 364).

Matthes et al. beobachteten bei Untersuchungen mit dem Blutapheresesystem MCS 3P[®] (Haemonetics, Braintree, MA), dass die Konzentrationen von 2,3-DPG und ATP bei in SAG-M gelagerten leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten über einen längeren Lagerungszeitraum besser bewahrt werden konnten im Vergleich mit in der Literatur bekannten Werten für in SAG-M gelagerte Erythrozytenkonzentrate. Nach 14 Lagerungstagen betrug bei Matthes et al. die Konzentration von ATP noch nahezu 88 % des Ausgangswertes und die 2,3-DPG-Spiegel lagen bei nahezu 50 % des Ausgangswertes (240). Matthes et al. schlossen leider keine Kontrollgruppe mit einem konventionellen Blutentnahmesystem in ihre Studie mit ein. Sie stellten keine absoluten Zahlen ihrer Ergebnisse in ihrer Publikation zur Verfügung, sondern lediglich Diagramme, was einen direkten Vergleich der Werte erschwert. Bei der Apheresetechnik erfolgt der Zusatz der Antikoagulanzlösung kontinuierlich zu dem entnommenen Blut. Die bessere Bewahrung der ATP- und 2,3-DPG-Konzentration führten Matthes et al. auf die „schonendere“ Blutentnahme zurück (240). Die Blutsammlung mit kontinuierlichem Hinzufügen der Antikoagulanzlösung erfolgt bei der ABC[®]-Waage in ähnlicher Weise wie bei der Apheresetechnik. In der vorliegenden ABC-Studie zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede der 2,3-DPG- und der ATP-Konzentration zwischen den beiden Gruppen, die 2,3-DPG-Konzentration war in beiden Gruppen nahezu gleich ($p = 0,99$). So stellt das kontinuierliche Zufügen von CPDA-1 in Bezug auf eine bessere Konservierung der Konzentrationen von ATP und 2,3-DPG keinen Vorteil dar.

5.4. Hämolytische Parameter

5.4.1. Freies Hämoglobin und Hämolysate

Der rote Blutfarbstoff Hämoglobin liegt sowohl intra- als auch extrazellulär vor. In den Erythrozyten nimmt Hämoglobin ungefähr 98 % des nichtwässrigen Inhaltes ein. Mehr als die Hälfte des Hämoglobins befindet sich in membrangebundenen Vesikeln (147, 165).

Aufgrund der ausgesprochenen Exposition des Hbs gegenüber O₂ unterliegt dieses in besonderen Maßen einer starken oxidativen Belastung. Trotz zelleigener antioxidativer Schutzmechanismen kommt es kontinuierlich zu Denaturierungen des Moleküls.

Erythrozyten verfügen mit der Vesikulation über einen Mechanismus, sich von geschädigten Zellbestandteilen zu entledigen (147). So wird unter physiologischen Bedingungen *in vivo* geschädigtes Hb kontinuierlich über Mikrovesikel aus den Erythrozyten abgeschieden. Dieser Prozess läuft ebenso unter Lagerungsbedingungen ab. Zudem wird beim Zelltod der Erythrozyten, der Eryptose, intrazelluläres Hb in den Extrazellulärraum freigesetzt (167).

In gelagertem Blut sind 50 bis 70 % des extrazellulären Hb in Form von Mikrovesikeln gebunden, der andere Teil liegt als freies Hb vor. Das sogenannte freie Hb ist von keiner Membran umgeben (65, 147, 165).

In beiden Gruppen der vorliegenden Studie kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg des fHbs, wobei sich eine höhere Variation des fHb-Gehaltes in der konventionellen Gruppe im Vergleich zur ABC-Gruppe fand ($p = 0,04$). Der Hb-Gehalt pro Konserve zeigte in der konventionellen Gruppe bereits eine Tendenz zu einer höheren Variation ($p = 0,07$). Die erhöhte Variation spiegelte sich in der Hämolyserate nicht wieder, da diese wiederum als Prozentwert unter Bezug auf den individuellen Hb-Gehalt der Konserve berechnet wird und sich somit die Variabilität „herauskürzt“. Ebenfalls zeigte der Hb-Wert der in der konventionellen Gruppe eingeschlossenen Spender bereits vor der Spende eine höhere Variation, welche jedoch nicht signifikant war.

Am Ende der 49-tägigen Lagerungszeit lag die Hämolyserate in der ABC-Gruppe bei 0,47 % (SD 0,14) und in der konventionellen Gruppe bei 0,44 % (SD 0,13). Diese Werte befinden sich deutlich unterhalb den Vorgaben des European Council von 0,8 % für Vollblutkonserven (120) und der AABB (American Association of Blood Banks) von 1,0 % (90, 200). Die derzeitig überwiegend verwendeten Erythrozytenkonzentrate weisen, je nach Quelle und verwendeter Konservierungslösung, eine durchschnittliche Hämolyserate zwischen 0,2 und 0,4 % nach einer fünf- bis sechswöchigen Lagerung auf (90, 165).

Bei Picker et al. lag die Hämolyserate mit 0,31 % (SD 0,13) bei in CPDA-1 gelagertem leukozytendepletiertem Vollblut am Tag 49 unterhalb der in der vorliegenden Studie gemessenen Hämolyserate (280). Ebenfalls bei leukozytendepletiertem CPDA-1-Vollblut fanden Neumeister et al. am 49. Lagerungstag eine Hämolyserate von 0,30 (SD 0,15) % (270), bei v. Bormann et al. lag sie bei 0,28 % (367).

Es bleibt spekulativ, ob die Entnahmetechnik der ABC[®]-Waage für die geringere Variation des fHb-Gehaltes in der ABC-Gruppe verantwortlich sein mag. Bezogen auf die Technik der kontinuierlichen Antikoagulanzzermischung mit dem gesammelten Blut beobachteten Matthes et al. in ihrer Studie mit dem Blutapheresesystem MCS 3P[®] (Haemonetics, Braintree, MA, USA) keine signifikanten Differenzen von fHb im Vergleich zu anderen in der Literatur veröffentlichten Referenzwerten (240).

Bekannt ist, dass interindividuell große Unterschiede der Hämolyserate bestehen. Die Erythrozyten einiger Spender überstehen die Lagerung mit einer geringeren Hämolyserate als die Erythrozyten anderer Spender (90, 165, 168).

Wie bereits im Kapitel „Leukozytendepletion“ beschrieben, reduziert eine Leukozytenfiltration im Anschluss an die Blutsammlung die Hämolyse (149, 156, 167, 168, 280, 302, 400). Leukozyten konsumieren zum einen fortwährend Glukose und setzen zum anderen Proteasen und Phospholipasen u. a. frei, welche ihrerseits einen Zellschaden bedingen können (165).

Über die Lagerungszeit diffundiert der in dem PVC-Material (Polyvinyl-Chlorid) der Lagerungsbeutel enthaltene Weichmacher DEHP (Di-2-Ethylhexylphthalat) in die Blutkomponente und kann in der Membran und im Zytosol der Erythrozyten nachgewiesen werden. Phthalatsäureester gehen Bindungen mit Bestandteilen des Membranskelettes ein und scheinen die Membran zu stabilisieren, was vermutlich eine Reduktion der Hämolyse bedingt (74, 83, 255). Die Lagerung von Vollblut oder Erythrozyten in Konserven mit alternativen Weichmachern war überwiegend mit einer verstärkten Hämolyse und einem erhöhten Verlust der Verformbarkeit einhergehend (74). Auch das in der Antikoagulanzzlösung enthaltene Citrat hat einen stabilisierenden Einfluss auf die Zellmembran. Die Beimengung von Mannitol zum Lagerungsmedium zeigt ebenfalls einen stabilisierenden Effekt auf die Zellmembran und kann die Hämolyse vermindern (167, 168). Hess et al. beobachteten, dass das Hinzufügen von Mannitol zu ihren experimentellen additiven Lösungen (Grundsubstanz SAG) nach einer 12-wöchigen Lagerungszeit die Hämolyserate von 6 % (EAS-67 ohne Mannitol) auf 0,6 % (EAS-67 mit 30 bzw. 45 mmol/l Mannitol) verminderte (167). Der höhere Anteil von Mannitol in AS-1 führt vermutlich zu der geringeren Hämolyserate im Vergleich zu in SAG-M gelagerten

Erythrozyten (mittlere Hämolyserate in SAG-M 0,34 % (SD 0,22 %) und in AS-1 0,25 % (SD 1,7 %)) (168).

Außerhalb der Erythrozyten und der Mikrovesikel dissoziiert das Hämoglobin-Tetramer in Dimere. In der Zirkulation werden die Hämoglobin-Dimere relativ schnell an Haptoglobin-Dimere gebunden und gelangen in dieser Form in das retikuloendotheliale System zum weiteren Abbau. Die endgültige Elimination erfolgt renal (355). Haptoglobin liegt normalerweise in einer Konzentration von 10 bis 52 μM vor und ist sättigbar. Unter physiologischen Bedingungen ist dieser Bestand an Haptoglobin ausreichend, um das durch die Transfusion anfallende fHb abzufangen, auch wenn berücksichtigt werden muss, dass innerhalb der ersten 24 Stunden nach erfolgter Transfusion bis zu 30 % der transfundierten Erythrozyten zusätzlich durch das retikuloendotheliale System aus der Zirkulation entfernt werden. Durchschnittlich müssten mehr als 100 Transfusionseinheiten (Erythrozytenkonzentrate) verabreicht werden, um das Haptoglobinsystem zu überlasten (168). Im Falle von pathologischen Zuständen des Empfängers sollte dennoch in der Praxis Vorsicht geboten sein. Liegt z. B. eine hämolytische Anämie vor, könnte der Haptoglobinbestand bereits vollständig gesättigt sein. Freies, nicht an Speicherproteine gebundenes Eisen kann oxidativen Stress induzieren und zytotoxisch wirken (z. B. auf Endothelzellen, proximale Nierentubuli) (65, 168, 334).

Zudem besitzt Hb eine starke Bindungsaffinität gegenüber NO. Die Eisenbindungsstellen des Hbs sind gegenüber NO deutlich stärker affin als gegenüber O_2 (294). NO wird sowohl von den Gefäßendothelzellen als auch von den Erythrozyten sezerniert und bewirkt eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen, in deren Folge es zu einer Steigerung des Blutflusses kommt. Die durch die Bluttransfusion anfallende hohe Konzentration von fHb könnte möglicherweise zu einer überproportional hohen Bindung („*scavenging*“) von gefäßwandnahe NO im Organismus des Transfusionsempfängers führen. Konsekutiv könnte dadurch das vasorelaxierende Potential der mikrozirkulatorischen Autoregulation vermindert werden. Schwere pulmonale und systemische Vasokonstriktionen könnten die Folge sein (211, 353, 355). Näheres hierzu im Kapitel „NO und ATP“.

Die Bestimmung der Hämolyserate als Qualitätsparameter geht in die Anfänge der Transfusionsmedizin zurück. Erstmals wurde die Hämolyserate von Rous und Turner 1916 beschrieben (168). Das Ziel einer optimalen Blutlagerung besteht darin, dass möglichst

viele funktions- und lebensfähige Erythrozyten zur Transfusion zur Verfügung stehen. Geschädigte Zellen und Zellbestandteile beeinflussen die Lagerungsbedingungen in einer Transfusionseinheit negativ. Jedoch hat sich auch gezeigt, dass eine Verminderung der Hämolyse gelagerter Erythrozyten nicht direkt zu einer verbesserten Lebensfähigkeit der Zellen nach der Transfusion führt. Die Hämolyserate ist daher kein Parameter, um ausreichend die Lebensfähigkeit der Erythrozyten zu beschreiben (165).

5.4.2. Kalium

Das in den Blutkonserven beider Gruppen während der Lagerungszeit kontinuierlich ansteigende Kalium resultiert zum einen auf der sich zunehmend einschränkenden Funktion der Na^+/K^+ -ATPase. Zum anderen kommt es infolge der Hämolyse gelagerter Erythrozyten zu einer Freisetzung von K^+ . Das intrazelluläre K^+ wird dabei komplett in das suspendierende Medium freigesetzt.

Die signifikant erhöhte Variation der K^+ -Konzentration in der konventionellen Gruppe wäre möglicherweise auf die höhere Variation des fHb-Gehaltes zurückzuführen. Die erhöhte Variation des fHbs spiegelte sich in der Hämolyserate nicht wieder, da die Hämolyserate wiederum als Prozentwert unter Bezug auf den individuellen Hb-Gehalt der Konserve berechnet wird und sich somit die Variabilität „herauskürzt“.

Die Na^+/K^+ -ATPase gewährleistet über die Aufrechterhaltung der asymmetrischen Kationenverteilung das Membranpotential. Unter Verbrauch von ATP werden durch die ATPase im Austausch gegen drei Na^+ -Ionen zwei K^+ -Ionen in die Zelle transportiert. 98 % des Gesamt- K^+ befinden sich intrazellulär, nur 2 % liegen unter physiologischen Bedingungen extrazellulär vor. Mit sich verringerndem Energieangebot während der Lagerungszeit kommt es zu einer extrazellulären Akkumulation von K^+ . Zudem ist die Na^+/K^+ -ATPase sehr sensibel gegenüber Temperaturveränderungen und arbeitet verlangsamt bei niedrigen Temperaturen (173, 200, 400). Bei Temperaturabkühlung auf 4° C kommt es entlang des elektrochemischen Gradienten zu einem Eintritt von Na^+ in die Zellen und zu einem Austritt von K^+ aus den Erythrozyten, bis ein elektrochemisches Gleichgewicht über die Membran erreicht ist (200).

Physiologisch liegt die systemische K^+ -Konzentration bei Erwachsenen in einem Bereich von 3,6 bis 5,0 mmol/l (162). Erhöhungen der systemischen K^+ -Konzentration über

5,0 mmol/l sind mit einer Steigerung der neuromuskulären Erregbarkeit assoziiert. In schlimmsten Fällen kann durch eine Hyperkaliämie ein Kammerflattern, Kammerflimmern oder eine Asystolie ausgelöst werden. Eine Hyperkaliämie wirkt negativ inotrop und negativ dromotrop auf das Herz. Häufig finden sich EKG-Veränderungen mit QRS-Verbreiterung, QT-Verkürzung, P-Abflachung und Veränderung der T-Welle (zeltförmiges T). An neuromuskulären Symptomen können Parästhesien, Myoklonien und Paresen auftreten (162).

K⁺ wird zu 90 % renal und zu 10 % enteral ausgeschieden. Die renale Ausscheidungskapazität kann dabei mehr als das Doppelte der normalerweise täglich aufgenommenen K⁺-Menge von 100 mmol betragen (162).

Während der Transfusion gelagerten Vollblutes und/oder gelagerter Erythrozytenkonzentrate können passagere Hyperkaliämien auftreten. Deren Ausprägung zeigt sich abhängig von der Transfusionsgeschwindigkeit. Linko et al. beobachteten passagere Hyperkaliämien bei Transfusionsgeschwindigkeiten für Vollblut von mehr als 0,4 ml/min/kg Körpergewicht (203, 221). Bei schnelleren Transfusionsgeschwindigkeiten wurden auch schwere Hyperkaliämien beobachtet, welche vereinzelt Asystolien bedingt haben. Hingegen besteht bei langsamen Transfusionsgeschwindigkeiten nahezu keine Gefahr schwerwiegender und klinisch relevanter Hyperkaliämien. Nach erfolgter Transfusion wird durch die Reaktivierung des Erythrozytenstoffwechsels K⁺ schnell wieder von den Erythrozyten aufgenommen (203, 221, 400). Klinische Bedeutung erlangt eine Hyperkaliämie vor allem dann, wenn eine Niereninsuffizienz oder eine Azidose beim Empfänger vorliegt (162). Ebenso ist bei Kindern die Gefahr einer schwerwiegenden und klinisch relevanten Hyperkaliämie infolge von Transfusionen vor allem länger gelagerten Blutes erhöht (199).

5.5. Gerinnung

Die Gerinnungsfaktoren V und VIII gelten allgemein als sehr instabil. Ähnlich wie in der vorliegenden ABC-Studie beobachteten auch andere Untersuchungsgruppen eine Abnahme der Konzentrationen bzw. der Aktivitäten von Faktor V und von Faktor VIII während der Lagerung von Vollblut. Faktor VIII ist dabei im Allgemeinen von einer stärkeren Abnahme als Faktor V betroffen (23, 177, 270, 271, 280, 302, 368).

Bereits zuvor zeigte sich, dass eine Leukozytendepletion zu einer besseren Bewahrung der Aktivitäten von Faktor V und VIII führt (280, 302, 326, 367). So registrierten v. Bormann et al. bei Lagerung von leukozytendepletiertem Vollblut in CPDA-1 nach 49 Lagerungstagen eine Faktor-VIII-Restaktivität von 53 %, bei ungefiltertem CPDA-1-Vollblut lag die Faktor-VIII-Aktivität am 49. Lagerungstag bei 40 % (367). Neumeister et al. haben bei ebenfalls in CPDA-1 gelagertem leukozytendepletierten Vollblut am 49. Lagerungstag eine Faktor-VIII-Aktivität von 54 % gemessen (270).

In der vorliegenden ABC-Studie konnte eine Restaktivität von Faktor VIII von mehr als 50 % am Ende der 49-tägigen Lagerung nicht bewahrt werden. Bereits mit dem 7. Lagerungstag war die Faktor-VIII-Aktivität in der ABC-Gruppe auf 54,7 (SD 13,7) % und in der konventionellen Gruppe auf 56,5 (SD 15) % reduziert. Der beobachtete rasche Aktivitätsverlust von Faktor VIII innerhalb der ersten Lagerungswoche bestätigte die Ergebnisse anderer Untersuchungsgruppen, welche sowohl bei leukozytendepletiertem als auch bei nicht-leukozytendepletiertem Vollblut den Hauptanteil des Aktivitätsverlustes innerhalb der ersten Lagerungswoche registrierten (280, 302, 367). Eine Leukozytendepletion bedingt eine deutlich langsamere Abnahme der Faktor-VIII-Aktivität im weiteren Lagerungsverlauf als bei einer Lagerung ohne Leukozytendepletion (302, 367). Nilsson et al. beobachteten bei nicht-leukozytendepletiertem in CPD gelagertem Vollblut bereits innerhalb der ersten 24 Lagerungsstunden den größten Anteil des Aktivitätsverlustes (271). Hughes et al. registrierten bei in 4° C gelagertem nicht-leukozytendepletiertem Vollblut die stärkste Abnahme der Faktor-VIII-Aktivität zwischen sechs und 18 Stunden. In der vorliegenden Studie erfolgten keine weiteren Messungen vor der Leukozytendepletion und zwischen den Lagerungstagen 1 und 7, sodass eine genauere Beschreibung des Zeitverlaufes der Faktor-VIII-Aktivitätsabnahme, welche möglicherweise auch schon mit Beginn der Blutsammlung einsetzt, nicht dargestellt werden konnte. Bis auf Hughes et al. und Nilsson et al. verzichteten auch die zuvor erwähnten Untersuchungsgruppen auf weitere Messungen zwischen den Tagen 1 und 7.

Zwischen Lagerungstag 7 und 42 nahm die Faktor-VIII-Aktivität in der vorliegenden Studie langsamer ab, reduzierte sich dann noch einmal stärker mit dem 49. Tag auf 35,7 (SD 14,2) % in der ABC-Gruppe und auf 37,7 (SD 13,8) % in der konventionellen Gruppe. Einen ähnlichen Verlauf beobachteten Picker et al. Sie beobachteten am 42. Lagerungstag eine Faktor-VIII-Aktivität von 54,9 (SD 13,6) % und am 49. Lagerungstag eine Aktivität von 38,8 (SD 8,8) % (280).

Die Aktivität von Faktor VIII ist temperaturabhängig. Hughes et al. registrierten einen Abfall der Faktor-VIII-Aktivität in bei 4° C gelagertem, nicht-leukozytendepletierten Vollblut (in CPD) nach 18 Stunden auf 56 %. Bei Lagerung bei 22° C betrug die Aktivität nach 18 Stunden hingegen 65 bis 70 % (177). Bei dem Vergleich verschiedener Leukozytenfiltersysteme (u. a. MacoPharma) beobachteten Heiden et al. – im Rahmen der Herstellung von therapeutischen Plasma aus CPD-Vollblut – sowohl vor als auch nach der Filtration leicht höhere Konzentrationen für die Faktoren V und VIII, sofern diese vor der Filtration bei Raumtemperatur gelagert wurden im Vergleich zur Lagerung bei 4° C vor der Filtration. Die Verarbeitung des gewonnenen Vollblutes erfolgte bei Heiden et al. zwischen sechs und 22 Stunden, dabei konnten die Ergebnisse dieser Studie die von Hughes et al. registrierte rasche Aktivitätsabnahme der Faktoren V und VIII nicht widerspiegeln (159).

Die Abnahme der Faktor-V-Aktivität war in der ABC-Studie nur gering ausgeprägt und zeigte am 49. Lagerungstag mit 74,7 (SD 9,5) % in der ABC-Gruppe und 75,1 (SD 8,0) % höhere Konzentrationen als bei anderen Untersuchungsgruppen. Bei Picker et al. betrug die Faktor-V-Konzentration am 49. Lagerungstag 62,4 (SD 13) % (280), bei Neumeister et al. lag sie bei 65 (SD 20) % und v. Bormann et al. fanden an Tag 49 eine Aktivität von 61 % bei leukozytendepletiertem Vollblut (367). Auch auf die Faktor-V-Aktivität wirkt sich die Leukozytendepletion günstig aus. Bei nicht-leukozytendepletiertem CPDA-1-Vollblut betrug die Faktor-V-Aktivität am 49. Lagerungstag bei v. Bormann et al. lediglich 36 % (367). Solheim et al. beobachteten ebenfalls eine stärkere Abnahme der Faktor-V-Aktivität während der Lagerung von nicht-leukozytendepletiertem CPDA-1-Vollblut als nach Filtration. Zudem registrierten sie mit dem Filtrationsprozess eine Abnahme der Faktor-V-Aktivität, d. h. im Vergleich zum Vorfiltrationswert war die Faktor-V-Aktivität nach der Leukozytendepletion um 16 % erniedrigt (326). Solheim et al. erklärten diese Abnahme damit, dass mit der Leukozytendepletion ungefähr 95 % der Thrombozyten in den Filtern zurückgehalten werden. Das Zurückhalten der Thrombozyten im Filter kann zur Aktivierung und Bindung von Faktor V während des Filtrationsprozesses führen, was dessen Konzentration erniedrigt. Jedoch verhindert das Zurückhalten der Thrombozyten im Leukozytenfilter so zum großen Teil die Aktivierung und Bindung von Faktor V während der folgenden Lagerungszeit (326). Gegensätzlich zu diesen Beobachtungen fanden Neumeister et al. keine Reduktion der Faktor-V-Konzentration nach der Leukozytenfiltration im Vergleich zum Vorfiltrationswert (270). Dabei verwendeten

sowohl Neumeister et al. als auch Solheim et al. das gleiche Leukozytenfiltersystem Leukotrap A1® (PallMedical) (270, 326).

Für die ABC-Studie gilt auch hier das oben Gesagte, es erfolgten keine Gerinnungsanalysen vor der Leukozytendepletion und zwischen Tag 1 und Tag 7 der Lagerung, sodass ein separater Einfluss durch den Prozess der Leukozytenfiltration nicht geprüft werden konnte.

Weiterhin ist bekannt, dass abhängig von der Blutgruppe der Spender die Stärke der Aktivitäten von Faktor V und Faktor VIII variiert. So ist die Aktivität von Faktor VIII bei Spendern mit der Blutgruppe A höher als bei Spendern mit der Blutgruppe 0 (177, 182, 200, 273). In der vorliegenden ABC-Studie wurde durch das Randomisierungsverfahren sichergestellt, dass der Anteil von Spendern mit Blutgruppe A oder 0 in beiden Gruppen identisch war. Damit wurde ein relevanter Einfluss der Blutgruppenverteilung auf die Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen.

Warum bei den Messungen der plasmatischen Koagulationsfaktoren in leukozytendepletiertem und in CPDA-1 gelagertem Vollblut die Aktivität insbesondere von Faktor VIII am 49. Lagerungstag zwischen den Untersuchungsgruppen differiert, kann nicht eindeutig erklärt werden. Eventuell haben die relativ geringe Studiengröße bei v. Bormann ($n = 6$) und Neumeister ($n = 14$) und eine größere Variationsbreite der Ergebnisse einen Anteil hieran. Möglicherweise sind die Differenzen bei den Ergebnissen auch teilweise durch die verwendeten unterschiedlichen Testkits bedingt, welche zur Bestimmung von den jeweiligen Untersuchungsgruppen verwendet wurden.

Über die Lagerungszeit kam es zu keiner Aktivierung des Koagulationssystems. Die geringgradige Zunahme der D-Dimere ist nicht im Rahmen einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems zu werten. Die Konzentration von Antithrombin veränderte sich nur unwesentlich in beiden Untersuchungsgruppen. Keine wesentlichen Veränderungen waren bei den TAT-Komplexen zu beobachten, die meisten Werte lagen unterhalb der Messbarkeitsgrenze.

Ein Einfluss auf die plasmatischen Koagulationsparameter durch das Sammelverfahren wurde in der vorliegenden Studie nicht beobachtet. Es konnte bestätigt werden, dass das Gerinnungspotential von leukozytendepletiertem Vollblut nach einer 49-tägigen Lagerung

teilweise erhalten bleibt. Bei therapeutischem Plasma (fresh frozen plasma) wird eine Faktor-VIII-Aktivität von mindestens 70 % vorausgesetzt (120). Bekannt ist, dass eine Koagulation gewährleistet werden kann, sofern die Koagulationsfaktoren mindestens 20 bis 30 % ihrer Ausgangsaktivität aufweisen (271).

Wie bereits weiter oben erwähnt, hat sich in den westlichen Industrienationen die Blutkomponenten-Therapie etabliert und ist derzeit gängiger Standard in der Transfusionspraxis. In Bezug auf eine massiven Hämorrhagie, einen schweren hämorrhagischen Schock als auch bei einer Koagulopathie mehrten sich in jüngerer Zeit jedoch Stimmen, dass die Verabreichung von Vollblut der Verabreichung von Blutkomponenten überlegen sein könnte (257, 338, 398).

Bezüglich der Effektivität von gelagertem Vollblut auf das Gerinnungspotential im Empfängerorganismus konnten Laine et al. gegenüber der Verwendung von Komponenten (Erythrozytenkonzentrate und therapeutisches Plasma) im Rahmen von Lebertransplantationen keinen Nachteil beobachten. Von 33 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten erhielten 18 Patienten überwiegend Vollblut, 15 Patienten wurden mit Komponenten behandelt. Einige der Patienten in der Vollblutgruppe erhielten zusätzlich bedarfsangepasst Erythrozytenkonzentrate und therapeutisches Plasma. In beiden Gruppen wurden zudem in nahezu gleichen Anteilen Kryopräzipitate und Thrombozyten substituiert. Das mittlere Alter des Vollblutes betrug 14 Tage, das der Erythrozytenkonzentrate 16 Tage. Am Ende der Operationen bestand zwischen den beiden Untersuchungsgruppen lediglich ein signifikanter Unterschied in der Fibrinogen-Konzentration mit einer leicht niedrigeren Fibrinogen-Konzentration in der Vollblutgruppe. Alle weiteren Koagulationsparameter zeigten keine signifikanten Unterschiede. Es kam zu keiner exzessiven Blutung und zu keinem schweren klinischen Zwischenfall. Als deutlicher Vorteil stellte sich heraus, dass die Patienten der Vollblutgruppe einer signifikant geringeren Spenderexposition ausgesetzt waren (209).

Mit einer Bluttransfusion soll neben dem Ausgleich eines Defizites der O₂-Transportkapazität auch die Blutviskosität aufrechterhalten werden. Während eines Blutverlustes kommt es zunächst kompensatorisch zu einer Erhöhung des Herzzeitvolumens und zu einer vermehrten arterio-venösen O₂-Extraktion (4, 355). Sofern der Hkt unter 20 % (das entspricht ungefähr einer Hb-Konzentration von 6 g/dl) gefallen ist, nimmt die O₂-Versorgung dramatisch ab. Es besteht ein erhöhtes Risiko für Gewebeschäden sowie eine erhöhte Mortalität. Beim hämorrhagischen Schock soll zunächst das defizitäre Volumen mit Plasmaexpandern ausgeglichen werden. Bei leichten oder chronischen Anämien steht die Erhöhung der O₂-Transportkapazität im Vordergrund (352, 355).

5.6. Rheologische Eigenschaften

Nach den Leitlinien des European Council und der American Association of Blood Banks (AABB) wurden Richtlinien erarbeitet, die eine qualitativ hochwertige Transfusionspraxis gewährleisten sollen. Entscheidenden Einfluss bei der Festlegung der derzeit gültigen Qualitätsparameter hat die Überlebensfähigkeit der Erythrozyten nach der Transfusion. Es wurde festgelegt, dass sich mindestens 75 % der transfundierten Erythrozyten 24 Stunden nach erfolgter Transfusion weiterhin lebensfähig in der Zirkulation befinden sollen und dass die Hämolyse weniger als 1 % in den USA und weniger als 0,8 % in der Europäischen Union betragen soll (120, 387, 400).

In jüngerer Zeit mehren sich jedoch die Hinweise, dass die während der Lagerung von Blutprodukten an den Erythrozyten auftretenden Veränderungen möglicherweise negative Folgen auf den Empfängerorganismus haben. Das Ziel eines möglichst langfristigen Überlebens der roten Blutzellen im Empfängerorganismus erscheint vor diesem Hintergrund wahrscheinlich nicht mehr auszureichen, um die Qualität von gelagerten Blutprodukten festzulegen. Veränderungen der rheologischen Parameter, die während der Lagerung auftreten, sind möglicherweise mitverantwortlich für negative Auswirkungen gelagerter Blutprodukte. Die Untersuchung der Verformbarkeit und der Aggregation gehört bisher nicht zu den Standarduntersuchungen, um die Qualität von Blutprodukten zu beurteilen.

5.6.1. Untersuchungsmethoden der Verformbarkeit

Die Verformbarkeit lässt sich mit verschiedenen Methoden untersuchen. Zu den ältesten Verfahren zählt die Filtrationsmethode nach Reid. Daneben gibt es weitere Verfahren wie die Mikropipettentechnik, das Rheoskop und die Ektazytometrie.

Bei der Filtrierungsmethode nach Reid et al. passiert Vollblut unter negativem Druck eine durchlässige Filtermembran mit definierter Porengröße (300). Als Membranen werden z. B. Polykarbonat oder Nickel-Maschen-Filter verwendet. Die Passagezeit des Blutes korreliert dabei mit der Verformbarkeit der Erythrozyten. Nachteilig an dieser Methode erweisen sich Fabrikationsunregelmäßigkeiten der Porengröße sowie ein relativ leichtes Verstopfen der Poren durch Erythrozyten und Leukozyten. Von dieser Methode gibt es zahlreiche Abwandlungen und Weiterentwicklungen (153), wie z. B. automatisierte „cell transit analyser“ (CTA) (138). Die Filtrationstechniken sind sehr sensitiv gegenüber einem veränderten Verhältnis von Oberfläche-zu-Volumen, jedoch weniger sensitiv gegenüber einer veränderten internen Viskosität (251).

Mit der Mikropipettentechnik lässt sich die Verformbarkeit einzelner Erythrozyten bestimmen. Einzelne rote Blutzellen werden über einen Sog in die Pipettenöffnung hineingesogen. Die Flexibilität individueller Erythrozyten errechnet sich aus der Menge an negativem Druck, welcher benötigt wird, um einen Teil des Erythrozyten bzw. diesen vollständig zu aspirieren. Unter Verwendung von kleinen Pipettenöffnungen lässt sich die Flexibilität der Membran bestimmen. Mit größeren Pipettenöffnungen lassen sich die interne Viskosität und das Verhältnis von Zelloberfläche-zu-Volumen messen. Nachteilig erweist sich, dass jeder einzelne Erythrozyt individuell untersucht werden muss. Für größere Populationen, z. B. die Untersuchung von Erythrozyten in einer Blutkonserve, ist diese Methode äußerst aufwendig (74, 251).

Eine weitere Methode sind optische Pinzetten, sogenannte „optical tweezers“. Auch bei diesem Verfahren müssen Erythrozyten einzeln untersucht werden (178).

„Cell flow analyser“ arbeiten mit einer Strömungskammer, bei der Scherung durch eine künstlich erzeugte Strömung induziert wird. Über ein Mikroskop ist die Formveränderung der Zellen zu beobachten. Einige der von den Untersuchungsgruppen meist eigens entworfenen Geräte sind mit einer Temperaturadjustierung ausgestattet (301).

Die Ektazytometrie geht auf Entwicklungen von Bessis und Mohandas zurück (51, 121). Als kommerziell erhältliche Produkte arbeiten nach diesem Prinzip der LORCA™, der Rheodyn-SSD® (Myrenne GmbH, Aachen, Deutschland) und der RheoScan-D® (Sewon-Meditech, Korea). Beim RheoScan-D® wird durch die Erzeugung eines Vakuums eine

Scherung generiert. Der Rheodyn-SSD[®] und der LORCA[™] applizieren die Scherung über ein Couette-System. Im Gegensatz zum Rheodyn-SSD[®] ist der LORCA[™] mit einer Temperaturadjustierung ausgestattet (108, 152-154). Das Verformbarkeitsverhalten der Erythrozyten ist von der Temperatur abhängig. Die Verformbarkeitsindices unterscheiden sich, sofern sie bei Raumtemperatur von 22° C oder bei Körpertemperatur von 37° C gemessen werden (28, 108, 152).

Mit dem Couette-System wird eine Scherung generiert. Die Verformbarkeit steht in direkter Abhängigkeit von den Scherkräften, die auf den Erythrozyten einwirken. Die Bestimmung des Verformbarkeitsindex über eine scherungsabhängige Messung steht somit in einem Zusammenhang mit den Kräften, die unter physiologischen Bedingungen auf die Erythrozyten wirken (154).

Neuere Ansätze bestehen in der Untersuchung des Strömungsverhaltens von Erythrozyten in Modellen eines mikrozirkulatorischen Gefäßbettes. Damit soll am ehesten das physiologische Strömungsverhalten des Blutes in der Mikrozirkulation abgebildet werden. Die verwendeten Materialien bestehen aus Glasröhrchen oder Kunststoff (319). Bei diesen künstlichen Materialien wird jedoch der natürliche Einfluss der mikrozirkulatorischen Autoregulation vernachlässigt.

5.6.2. Verformbarkeit

Sowohl in der ABC-Gruppe als auch in der konventionellen Gruppe zeigte sich bei Scherspannungen über 0,5 Pa während des Lagerungszeitraumes eine kontinuierliche Abnahme der Verformbarkeit. Verschiedene andere Untersuchungsgruppen haben ebenfalls eine Abnahme der Verformbarkeit während der Lagerung von Erythrozyten beobachtet (49, 84, 105, 138, 180, 237, 301). Andere Untersucher konnten keine Veränderungen der Verformbarkeit während der Lagerung registrieren oder ihre Ergebnisse zeigten sehr inkonstante Werte über den untersuchten Lagerungszeitraum (50). Matthes et al. fanden bei mit dem Apheresesystem MCS 3P[®] gewonnenen Erythrozytenkonzentraten über die ersten vier Lagerungswochen sogar ein verbessertes Verformbarkeitsverhalten im Vergleich zu den Werten, die bei den Spendern vor der Blutspende erhoben wurden (240). Die einzelnen Studien unterscheiden sich dabei bezüglich der angewandten Untersuchungstechniken als auch der Lagerungsart der Blutprodukte, was einen direkten Vergleich der jeweiligen Ergebnisse erschwert.

In der vorliegenden ABC-Studie fanden sich hinsichtlich der Verformbarkeit, ausgedrückt durch den Elongationsindex, zwischen der konventionellen und der ABC-Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

Das Verformbarkeitsverhalten der Erythrozyten wird im Wesentlichen von drei Komponenten bestimmt:

1. dem Verhältnis von Oberfläche-zu-Zellvolumen,
2. der intrazellulären Viskosität (hauptsächlich bedingt durch die intrazelluläre Hb-Konzentration),
3. den viskoelastischen Eigenschaften der Zellmembran (24, 30, 67, 74, 81, 84, 88, 140, 153, 251, 253, 317, 349, 355).

Veränderungen an jeder einzelnen dieser Komponenten können sich auf das Verformbarkeitsverhalten auswirken. Während der Lagerungszeit werden sämtliche dieser Komponenten beeinflusst. Die Umverteilung der physiologischen Kationenverteilung und die dadurch bedingte osmotische Flüssigkeitsverschiebung führen zu Veränderungen des Verhältnisses von Zelloberfläche-zu-Zellvolumen und wirken sich auf die intrazelluläre Viskosität aus. Ebenso wird durch eine kontinuierliche Abscherung von Mikro- und Nanovesikeln die Zelloberfläche reduziert. Veränderungen an der Zellmembran sind äußerst umfangreich und mit heutigem Stand der Wissenschaft noch nicht vollständig verstanden. Veränderungen der Zellmembran werden hauptsächlich durch oxidativen Stress bedingt.

5.6.2.1. Verformbarkeit und Volumen

Durch das sich kontinuierlich vermindern Angebot an ATP steht den aktiven Ionentransportern der Zellmembran wie der Na^+/K^+ -ATPase und der Ca^{2+} -ATPase zunehmend weniger Energie zur Verfügung. Die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase ist zudem bei der niedrigen Lagerungstemperatur von 4° C eingeschränkt (200, 400). Die verminderte Transportleistung der Na^+/K^+ -ATPase, welche drei Na^+ -Ionen aus dem Erythrozyten hinaustransportiert, im Gegenzug zwei K^+ -Ionen in die Zelle hineinbefördert, resultiert in einer intrazellulären Akkumulation von Na^+ . Dem osmotischen Gradienten folgend kommt es konsekutiv zu einem Einstrom von Wasser in den Erythrozyten und dadurch zu einer Schwellung der Zelle. Das MCV erhöht sich, das Verhältnis von Oberfläche-zu-

Zellvolumen reduziert sich, gleichzeitig vermindert sich durch den Verdünnungseffekt die intrazelluläre Viskosität.

Ebenso ist die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase eingeschränkt. Zudem behindern hohe intrazelluläre Na^+ -Konzentrationen den Austausch von Ca^{2+} gegen Na^+ über den $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ -Austauscher (24), sodass über den Lagerungsverlauf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Eine intrazellulär erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird mit einer Versteifung des Membranskelettes, der Abscherung von Vesikeln, einer Störung der asymmetrischen Phospholipidverteilung in der Lipiddoppelschicht sowie der Aktivierung des Gardos-Kanals in Verbindung gebracht. Der Gardos-Kanal, sofern aktiviert, vermittelt einen K^+ -Ausstrom aus der Erythrozyten, einhergehend kommt es durch Wahrung der Elektroneutralität zu einem Ausstrom von Cl^- aus der Zelle. Durch die sich verändernde Kationenverteilung tritt, dem osmotischen Gradienten folgend, Wasser aus den Erythrozyten aus. Die Erythrozyten verkleinern sich, das MCV nimmt ab und die intrazelluläre Viskosität steigt an. Dieser Mechanismus steht demnach im Gegensatz zu dem osmotisch bedingten Wassereintritt infolge der erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentration. Fraglich ist, inwieweit sich diese gegensätzlichen Mechanismen kompensieren bzw. welcher der beiden Mechanismen einen stärkeren Einfluss ausübt, wobei sich im Allgemeinen eine Zunahme des MCV während der Lagerung beobachten lässt (56, 65, 89, 161, 301), jedoch andere Gruppen auch keine Veränderung des MCV beobachten konnten (5). Sowohl eine Erhöhung als auch eine Verminderung des intrazellulären Volumens und der intrazellulären Viskosität vermindern die Verformbarkeit (30).

5.6.2.2. Verformbarkeit und Veränderungen an der Zellmembran

Zahlreiche weitere Veränderungen ereignen sich während der Lagerung an der Erythrozytenmembran. Hierzu zählen eine stetig voranschreitende Vesikulation mit Lipid- und Membranverlust (191), durch oxidative Prozesse induzierte Veränderungen an Protein Bande 3, Spektrin, Lipiden und eine oxidative Schädigung des junktionalen Komplexes aus Aktin, Spektrin und Protein Bande 4.1 (74, 191). Es kommt zur Akkumulation von membrangebundenem Hb (388), zur Externalisierung von Phosphatidylserin (PS), zu einem Verlust von nicht verestertem Cholesterin aus der Erythrozytenmembran, vermutlich zu einem Verlust des Schutzproteins CD47 (191) bzw. zu einer konformationellen Veränderung von CD47 sowie zu einer vermehrten Carbonylierung von Proteinen (89). Auch gibt es Anhalt für eine enzymunabhängige Glykosylierung von

Spektrin mit konsekutiver Versteifung des Membranskelettes (233). Zudem verändern sich membrangebundene Chaperone, Proteasome und G-Proteine (63), Proteasen, Kinasen und Phosphatasen (11) und es kommt zu einer Desaminierung von Protein Bande 4.1. Mit Voranschreiten der Forschung, u. a. mittels Proteomanalysen, werden zunehmend weitere Aufschlüsse über die sich ereignenden Veränderungen und Schädigungen gewonnen. In jüngerer Zeit wird auch dem physiologischen Alterungsprozess der Erythrozyten vermehrte Aufmerksamkeit gewidmet und es werden Parallelen zwischen dem Altern der roten Blutzellen *in vivo* und *in vitro* gezogen (11, 65, 217). Die Veränderungen und Prozesse sind sehr komplex, viele sind bisher nicht vollständig geklärt.

Die Zellmembran besteht, wie eingangs beschrieben (siehe „Einleitung“, Kapitel „Erythrozytenaufbau“), aus einer Lipiddoppelschicht, welche auf einem zweidimensionalen, hexagonal angeordneten Netzwerk aus Spektrin- und Aktin-Filamenten ausgespannt ist. Die Enden der Spektrin-Tetramere sind mit Aktin und Protein 4.1 zu einem funktionalen Komplex verbunden. Es bestehen zwei Verbindungskomplexe zwischen der Lipiddoppelschicht und dem Membranskelett (siehe Abb. 1 in der „Einleitung“, Kapitel „Erythrozytenaufbau“).

Die eine Verbindung erfolgt über Glykophorin C mit Protein Bande 4.1, Aktin und Spektrin. An diesem Komplex sind zudem u. a. Protein Bande 3, Adducin und Demantin beteiligt.

Die andere Verbindung erfolgt über einen Komplex aus Protein Bande 3, Ankyrin und Spektrin. Hier wird Spektrin, nahe der Mitte seines Zentrums, von Protein Bande 3 über Ankyrin gebunden. Mit diesem Komplex sind weiterhin u. a. Protein Bande 4.2, Glykophorin A, CD47, Rh-AG und Rhesus-Komplexproteine assoziiert (253, 312).

Die Ausdehnungsfähigkeit, Entfaltung und Zurückfaltung der Spektrin-Filamente trägt maßgeblich zu der bemerkenswerten Elastizität des Membranskelettes bei. Bei der Verformung kommt es zur Entfaltung von bestimmten Anteilen der dreifach-helikalen Wiederholungen (triple helical repeats) des α - und β -Spektrins und anschließender Zurückfaltung (185, 233).

Die meisten der Membranproteine – mit Ausnahme von Aktin – sind Phosphoproteine, d. h. ihre Konformation kann über eine ATP-abhängige Phosphorylierung verändert werden. So kommt es vermutlich durch eine von dem Enzym Protein-Kinase-C katalysierte Phosphorylierung von Protein 4.1 (und/oder Spektrin) zu einer passageren Dissoziation des funktionalen Komplexes um das Protein 4.1 mit konsekutiver Erhöhung der Flexibilität

der Zellmembran (53, 146, 235, 236, 259). Manno et al. beobachteten, dass es infolge einer verstärkten Phosphorylierung von β -Spektrin durch die membrangebundene Casein-Kinase-I zu einer Zunahme der Verformbarkeit kam (236). Auch wird die Stärke der Verbindung zwischen Adducin und Aktin vermutlich über eine durch Protein-Kinase-C und Rho-Kinase katalysierte Phosphorylierung reguliert (10). Möglicherweise führen auch externe, auf die Membran wirkende Scherkräfte, d. h. passive Verformungen der Zellmembran, über die Phosphorylierung des Protein Bande 4.1-Komplexes zu lokalen Dissoziationen mit einer passageren Steigerung der Flexibilität (146).

Im Gegensatz dazu scheint eine Dephosphorylierung von Protein 4.1 und/oder Spektrin eine erhöhte Rigidität der Zellmembran zu bewirken (199, 259). Da die Phosphorylierungen ATP-abhängige Prozesse sind, ist vermutlich auch hierbei die intrazelluläre ATP-Konzentration von Relevanz. Wolfe et al. beobachteten bei der Lagerung von Erythrozyten in CPD über sechs Wochen eine zunehmende Instabilität zwischen den Verbindungen von Spektrin, Aktin und Protein Bande 4.1 (388). Diese Prozesse sind jedoch überaus komplex und nicht bis ins Detail verstanden.

5.6.2.3. Verformbarkeit und Vesikulation

Während der Lagerungszeit werden kontinuierlich Mikro- und Nanovesikel von der Erythrozytenmembran abgeschert (5, 147, 149). Die Vesikulation ist ein physiologischer Prozess, der auch unter *in vivo*-Bedingungen abläuft (63, 147, 385). Dabei handelt es sich zum einen um einen Mechanismus der Entwicklung und der Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen. So erfolgt die strukturelle Umwandlung vom Retikulozyten in die erythrozytäre diskoidale Form über die Bildung und Freisetzung von Vesikeln. Über eine Vesikulation funktionieren zudem eine Vielzahl biologischer Prozesse, u. a. die Kommunikation zwischen den Zellen (147).

Zum anderen scheint die Abscherung von Vesikeln in den Ablauf eines physiologischen Reinigungsprozesses integriert zu sein. Mit den Vesikeln können Abbauprodukte der Zelle, Endprodukte des Zellmetabolismus, schädliche Metabolite und durch oxidativen Stress beschädigte Proteine aus dem Erythrozyten externalisiert werden. Da die Erythrozyten über keinen Zellkern und daher über keine DNS verfügen, sind sie nicht zur Reparatur oder de-novo-Synthese von beschädigten Zellbestandteilen in der Lage. Ansonsten gesunde Erythrozyten können sich über die Vesikulation möglicherweise der Eliminierung entziehen, indem sie sich selbst von schädlichen Materialien und fehlerhaften Proteinen bereinigen (147, 385).

Über den zugrundeliegenden Pathomechanismus der Vesikulation existieren verschiedene Hypothesen. Vesikel bilden sich als kleine Bläschen an echinozytischen (stechapfelförmigen) Membranausläufern der Erythrozyten (147). Die Bildung von Mikro- und Nanovesikeln könnte über einen Ca^{2+} -abhängigen Prozess, eventuell mit Einbeziehung auf lipid-rafts basierender Prozesse, gesteuert werden (63, 313). Weitere Ursachen könnten eine Abnahme der durch Protein Bande 3 vermittelten Verbindung zwischen der Lipiddoppelschicht und dem Zytoskelett sein (64, 385), ggf. gesteuert über die Phosphorylierung von Protein Bande 3 über Tyrosinkinasen (147). Oder es kommt über eine Dephosphorylierung von Protein Bande 4.1 und/oder Spektrin zu einer Versteifung des Membranskelettes. Durch diese Versteifung würde die darüber liegende Lipiddoppelschicht unter eine so starke Spannung gesetzt werden, dass sich kleine umschriebene Membrananteile als Vesikel abschnüren (146). Salzer et al. beschrieben einen signifikanten Zusammenhang zwischen der intrazellulären ATP-Konzentration und dem Gehalt an Vesikeln in einer Transfusionseinheit (65). Möglicherweise tragen durch oxidativen Stress induzierte Veränderungen mit zur Vesikulation bei (83, 369).

Der Mechanismus der Vesikulation scheint *in vivo* durch die Milz beeinflusst zu werden. So lässt sich bei splenektomierten Individuen eine Akkumulation von z. T. verhältnismäßig großen Vesikeln in den Erythrozyten, sogenannte „pits“, beobachten (378, 384, 385).

Die individuelle Zusammensetzung der gebildeten Vesikel als auch ihre Größe (durchschnittlich zwischen 50 bis 250 nm) scheint im Allgemeinen sehr heterogen zu sein (147, 384, 385). Die *in vitro* unter Lagerungsbedingungen gebildeten Vesikel unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und vermutlich auch ihrer Größe von den natürlich *in vivo* gebildeten Vesikeln (62, 65, 147). Hauptsächlich sind Proteine, Lipide, Cholesterol und Hämoglobin in ihnen enthalten. An Membranproteinen sind bis auf Protein Bande 4.1 und Protein Bande 4.2 keine Bestandteile des Membranskelettes in den Vesikeln vertreten (147, 165). Daneben finden sich Protein Bande 3 bzw. dessen Abbauprodukte (385), Glykophorin (147), Chaperone, G-Proteine (63), Acetylcholinesterase und die mit lipid-rafts assoziierten Proteine Stomatin und Flottilin, Synexin und Sorcin (12, 313). Viele, aber nicht alle Vesikel, exprimieren auf ihrer Oberfläche Phosphatidylserin (PS) (141, 385, 386). Spinella et al. beobachteten, dass die Anzahl von mit PS angereicherten Mikropartikel mit voranschreitender Lagerungszeit zunahm (333), Almizraq hingegen fanden mit durchflusszytometrischen Bestimmungen eine Abnahme von PS auf Mikrovesikeln (5). Eine beträchtliche Anzahl der Vesikel enthält auch IgG und Komplementproteine

(complement-attack-complex C5-C9) (64, 307, 385). Am ehesten bedingt durch unterschiedliche Untersuchungstechniken herrscht zwischen den verschiedenen Studiengruppen Uneinigkeit über die genaue Verteilung der einzelnen Bestandteile (333), sowie wann und ob es während des *in vivo*-Lebens oder unter Lagerungsbedingungen *in vitro* – zu bestimmten Zeiten – zu einer verstärkten Vesikulation kommt.

Bosman et al. fanden mittels Gelelektrophorese und Proteomanalysen, v. a. während der ersten Lagerungswochen, dass Chaperone und G-Proteine in der Erythrozytenmembran abnehmen und sich in Vesikeln anreichern. Mit fortschreitender Lagerungszeit beobachteten sie in den Vesikeln eine Anreicherung von degradiertem Hb sowie von aggregiertem und degradiertem Protein Bande 3, wohingegen sich natives Protein Bande 3 in der Erythrozytenmembran verminderte. Das lipid-raft-assoziierte Protein Stomatin stieg im Verlauf der Lagerung in Mikrovesikeln stark an und verminderte sich in der Erythrozytenmembran (63). Greenwalt et al. registrierten ab dem 35. Lagerungstag in CPDA-1 und AS-1 eine signifikant verstärkte Abnahme von Phospholipiden (149). Bei *in vitro* gebildeten Vesikeln finden sich mehr Immunglobuline und Proteine des Komplementsystems als bei *in vivo* gebildeten Vesikeln (62). Nano- und Mikrovesikel unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung (63).

In vivo bilden Erythrozyten jeden Alters Vesikel. Vermutlich ist in der zweiten Lebenshälfte der roten Blutzellen der Verlust von Hämoglobin über die Vesikulation besonders ausgeprägt. *In vitro* beschreiben Karon et al. in der späten Lagerungsperiode einen signifikant erhöhten Verlust von Lipid über die Vesikulation (190). Greenwalt et al. beobachteten, dass die junge Fraktion von gelagerten Erythrozyten signifikant mehr Vesikel abschert als die ältere Fraktion (147).

Zudem ist die Abscherung von Vesikeln von der Art der Blutprodukte und von dem Lagerungsmedium abhängig (62, 147-149, 331). So werden von gelagertem Vollblut mehr Vesikel als von gelagerten Erythrozytenkonzentraten freigesetzt (148). Im Vergleich zur Lagerung in CPDA-1 enthalten Vesikel von in AS-1 gelagerten Erythrozyten prozentual signifikant weniger Cholesterol, Phospholipide und Proteine (149). In AS-1 scheint die Vesikulation geringer ausgeprägt zu sein als in SAG-M (331).

Im Organismus erfolgt die Eliminierung der Vesikel größtenteils im retikuloendothelialen System, über die Kupffer-Zellen in der Leber, zudem auch durch Makrophagen in Knochen, der Haut, Muskeln, der Milz, den Nieren und der Lunge (65, 147, 344, 378, 385, 386). Möglicherweise wirken mittransfundierte Mikro- und Nanovesikel immunmodulatorisch und/oder wirken prokoagulatorisch. Dadurch könnten die während der Lagerungszeit gebildeten Vesikel die Qualität der Blutkonserven negativ beeinflussen (147, 307). Auch kann das in den Vesikeln enthaltene Hb zu einer verstärkten „Abräumung“ („*scavenging*“) von NO führen und damit das vasodilatorische Potential in der Mikrozirkulation negativ beeinflussen (224).

Die kontinuierliche Abscherung von Vesikeln ist von einem Membran-, Protein- und Lipidverlust begleitet. Die Zelloberfläche und das Verhältnis von Zelloberfläche-zu-Zellvolumen vermindern sich, die Zelldichte (Densität) steigt fortschreitend an. Dieses führt dazu, dass die Verformbarkeit der Erythrozyten sowie die Flexibilität ihrer Membran abnehmen (11, 84). Mit der Vesikulation nimmt nicht nur Membransubstanz ab, sondern es wird auch denaturiertes Hb abgesondert. Die Abnahme der intrazellulären Hb-Konzentration führt zu einer Verminderung der intrazellulären Viskosität. Es lässt sich vermuten, dass das durch die Vesikulation abnehmende Verhältnis von Zelloberfläche-zu-Zellvolumen zu einem Teil durch die abnehmende intrazelluläre Viskosität ausgeglichen wird. Erythrozyten verlieren *in vivo* während ihrer Lebenszeit ungefähr 30 % ihres Volumens und 20 % ihres Hb-Gehaltes sowie 20 % ihrer Oberfläche. Dabei steigt ihre Hb-Konzentration um 14 % an (306, 378). Daraus lässt sich schließen, dass der Volumenverlust über die Vesikulation einen stärkeren Einfluss ausübt als die Abnahme des Hbs.

5.6.2.4. Verformbarkeit und oxidative Veränderungen

Aufgrund der hohen Bindungsaffinität des Hämoglobins zu O₂ sind die Erythrozyten in besonderen Maßen der schädlichen Wirkung oxidativer O₂-Radikale ausgesetzt. Die zelleigenen antioxidativen Schutzmechanismen sind auf die Co-Faktoren NADH und NADPH aus der Glykolyse und dem Pentose-Phosphat-Weg angewiesen. Durch das sich reduzierende Energieangebot und die verlangsamt ablaufenden Stoffwechselwege stehen die Co-Faktoren mit Fortschreiten der Lagerungszeit zunehmend weniger zur Verfügung. Da die PVC-Blutlagerungsbeutel für O₂ permeabel sind, sind die Erythrozyten auch unter Lagerungsbedingungen kontinuierlich O₂ ausgesetzt. Zudem verbleiben trotz Leukozyten-filtration ein Anteil von Leukozyten und Thrombozyten in den Blutkonserven, deren

Abbauprodukte ihrerseits oxidierendes Potential aufweisen. Die gebildeten Superoxide können mit Oxy- und Desoxyhämoglobin reagieren, sodass weitere freie Radikale entstehen, u. a. das extrem reaktive Hydroxyl-Radikal. Ferner kommt es zur Bildung von Methämoglobin und zur Entstehung von Hämoglobin-Hemichromen (24, 89). Durch Reaktion der Superoxide mit Proteinen und Lipiden können diese geschädigt werden. Oxidative Schädigungen von Spektrin und des junctionalen Komplexes können sich auf die Elastizität des Membranskelettes auswirken (74).

Von besonderer Relevanz scheint die oxidative Schädigung von Protein Bande 3 zu sein, welche bereits früh während der Lagerung auftritt (63, 84, 91, 190, 191, 204, 395). Das Protein Bande 3 verbindet als integrales Membranprotein das Membranskelett mit der Lipiddoppelschicht. Als Anionenaustauscher begünstigt es den Transport von CO_2 durch den Austausch von Cl^- und HCO_3^- über die Erythrozytenmembran (130). Protein Bande 3 unterstützt die Umwandlung von H_2CO_3 in HCl und trägt damit zur Acidifizierung des intrazellulären pHs bei, wodurch über den Bohr-Effekt eine passagere O_2 -Freisetzung von Hb getriggert wird (89). Möglicherweise ist Protein Bande 3 als Anionenaustauscher nach Aktivierung des Gardos-Kanals für den Transport von Cl^- verantwortlich (218). Über seine Interaktion mit Peroxiredoxin 2 ist das Protein in Redox-Reaktionen eingebunden (89). Zudem ist Protein Bande 3 das Zentrum eines Multiproteinkomplexes, welcher das Rhesus-Protein, Rhesus-assoziierte Proteine und CD47 beinhaltet. Protein Bande 3 verfügt über hochaffine Bindungsstellen für Enzyme der Glykolyse (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Aldolase und Phosphofruktokinase). Durch die Komplexbildung mit Protein Bande 3 werden die glykolytischen Enzyme inhibiert (65, 73). Somit nimmt Protein Bande 3 eine Schlüsselposition in der Stoffwechselregulation ein.

Oxidativer Stress sowie die Bindung von denaturiertem und aggregiertem Hämoglobin und von Hämoglobin-Hemichromen an die zytoplasmatische Domäne des Proteins Bande 3 führen zu einer Cluster-/Aggregatbildung und Denaturierung von Protein Bande 3, wodurch sich dessen oligomerischer Status verändert. Zudem beeinflussen vermutlich Strukturveränderungen und Quervernetzungen von anderen Proteinen, Ca^{2+} -getriggerte Abläufe sowie die Aktivierung bestimmter Caspasen den oligomeren Status von Bande 3. In der Folge ändert die Membrandomäne des Proteins ihre Konformation und es kommt zur Generierung eines Neoantigens, an welches sich autologes Immunglobulin G (IgG), möglicherweise auch die C3-Fraktion des Komplementsystems binden können. IgG und C3 sind starke Opsonine für den Complement Rezeptor 1 (CR1) der Phagozyten. Ihre

Bindung begünstigt vermutlich die Phagozytose der so markierten Erythrozyten in der Zirkulation (12, 63-65, 192, 204, 385).

Aufgrund seiner bedeutenden Rolle in der Verankerung des Zytoskeletts mit der Zellmembran wirken sich Strukturveränderungen von Protein Bande 3 auf die Morphologie und die Verformbarkeit der Erythrozyten aus (9, 62, 64). Defekte oder ein Mangel an Protein Bande 3 oder Ankyrin führen vermutlich zu einer Abnahme der Verbindung zwischen der Lipiddoppelschicht und dem Membranskelett (10) und kommen z. B. bei der hereditären Sphärozytose vor (88).

Oxidativer Stress begünstigt zudem die Tyrosin-Phosphorylierung von Protein Bande 3 durch die Tyrosinkinase Syk, infolgedessen sich die Affinität von Protein Bande 3 zu Ankyrin reduziert bzw. es zu einer Dissoziation zwischen Protein Bande 3 und Ankyrin kommt (130). Mit der Aufhebung der Verbindung zwischen Protein Bande 3 und Ankyrin könnte es zu einer Veränderung in der Verbindung zwischen Spektrin und der Lipiddoppelschicht kommen. Diese Strukturveränderungen könnten möglicherweise zu einer erhöhten Steifheit der Membran, zur Cluster- bzw. Aggregatbildung von Bande 3 führen und die Vesikulation begünstigen (130). Auch gibt es Anhalt dafür, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von oxidiertem Protein Bande 3 durch Syk direkt zur Ansammlung von Protein Bande 3-Aggregaten in der Zellmembran führt (276). Sowohl infolge der Tyrosin-Phosphorylierung des NH₂-Endes von Protein Bande 3, als auch bei Desoxygenierung durch die Bindung von Desoxy-Hb an das NH₂-Ende von Protein Bande 3, kommt es zu einer Freisetzung der glykolytischen Enzyme von der Membran (73).

Zusammengefasst wirken sich Strukturveränderungen der zytoplasmatischen Domäne von Protein Bande 3 auf die Stabilität der Erythrozytenmembran und der Verformbarkeit, auf die Stoffwechselaktivität der Erythrozyten und die Anionentransportkapazität aus. Sie führen möglicherweise zum Verlust von CD47 oder zu antigenetischen Veränderungen der Rhesus-Proteine. Bildung eines Neoantigens und Bindung von IgG erzeugen immunmodulatorische Auswirkungen (62, 64).

Durch oxidativen Stress kommt es auch zu Veränderungen von weiteren Membranproteinen. Insbesondere sind Spektrin, Protein 4.1 und Protein 4.2 betroffen. Es kann zu Quervernetzungen von Spektrin untereinander oder zwischen anderen Membranproteinen kommen (91, 395). Oxidativer Stress begünstigt die Aggregation von Hb. Aggregiertes Hb kann sich neben der Komplexierung mit Protein Bande 3 an weitere Bestandteile der Zellmembran anlagern und z. B. Komplexe mit Spektrin eingehen (12, 30, 65). Oxidativer

Stress stimuliert zudem über die Aktivierung der Cyclooxygenase die Synthese von Prostaglandin E₂. Prostaglandin E₂ fördert einen erhöhten Ca²⁺-Influx in die Erythrozyten (108).

5.6.2.5. Verformbarkeit und intrazelluläres Ca²⁺

Durch das sich während der Lagerungszeit kontinuierlich reduzierende Angebot an ATP steht der aktiven Ca²⁺-ATPase zunehmend weniger Energie zur Verfügung. Die Ca²⁺-ATPase transportiert Ca²⁺ aktiv aus der Zelle. Zudem behindern ansteigende intrazelluläre Na⁺-Konzentrationen einen Austausch von Ca²⁺ gegen Na⁺ über den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher. Über diesen Austauscher werden energieunabhängig drei Na⁺ gegen ein Ca²⁺ ausgetauscht. Der Na⁺-Transport erfolgt dabei von der Seite der höheren Na⁺-Konzentration auf die Seite der niedrigeren Na⁺-Konzentration. So kommt es mit voranschreitender Lagerungszeit zu einer intrazellulären Akkumulation von Ca²⁺.

Intrazellulär erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen aktivieren Caspasen und die μ -Calpain-Transglutaminase-2. Diese Enzyme können Membranskelettproteine degradieren und zu Quervernetzungen von Proteinen untereinander führen (11). Dadurch werden möglicherweise die Verbindungen zwischen Proteinen der Lipiddoppelschicht und dem Membranskelett abgeschwächt (306).

Intrazellulär erhöhtes Ca²⁺ wirkt sich auf die asymmetrische Lipidverteilung in der Lipiddoppelschicht aus. Die Flippase transportiert ATP-abhängig PS und PE in die innere Lage der Lipiddoppelschicht. Die Scramblase bewegt Phospholipide in der Doppelschicht bidirektional. Erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen inhibieren die Flippase und aktivieren die Scramblase (234). Zudem steht der Flippase mit abnehmenden ATP-Konzentrationen zunehmend weniger Energie zur Verfügung. Daraus resultiert eine Anreicherung von PS und PE in der äußeren Lage der Lipiddoppelschicht. Verhoeven et al. konnten ab der dritten Lagerungswoche (Erythrozytenkonzentrate in SAG-M) eine signifikante Aktivitätsabnahme der Flippase beobachten (362). Bestimmte Proteine wie Spektrin, Protein Kinase C und Annexin gehen Interaktionen mit PS ein, sofern sich dieses in der zytoplasmatischen Lage der Lipiddoppelschicht befindet. Diese Interaktionen mit PS stehen sehr wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Zellstabilität der Erythrozyten. Manno et al. präparierten Erythrozyten-Ghosts, sodass eine Aufhebung der asymmetrischen Lipidverteilung induziert wurde (Ghosts sind hämolysierte Erythrozyten

ohne zytoplasmatischen Inhalt). In der Folge beobachteten sie eine morphologische Veränderung von der diskoiden zu einer echinozytischen Erythrozytenform. Auch wenn Manno et al. keine Veränderung der mittels Ektazytometrie bestimmten Verformbarkeit feststellen konnten, zeigte sich jedoch mit Aufhebung der asymmetrischen Lipidverteilung eine verminderte Stabilität der Erythrozytenmembran (234). Bezüglich einer während der Lagerungszeit sich ereignenden Externalisierung von PS an die Membranoberfläche sind die in der Literatur zu findenden Daten teilweise sehr widersprüchlich. Relevy et al. beobachteten während einer 42-tägigen Lagerung von nicht-leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten eine zunehmende Externalisierung von PS an die Membranoberfläche (301). Im Gegensatz dazu konnten Bennett-Guerrero keine signifikante Veränderung der PS-Expression bei leukozytendepletierten, in AS-3 gelagerten Erythrozytenkonzentraten feststellen (49). Verhoeven et al. beobachteten trotz signifikanter Aktivitätsabnahme der Flippase nur bei 1,5 % (SD 0,3 %) von in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten nach einer fünfwöchigen Lagerung eine Exprimierung von PS auf der Zelloberfläche (362).

Die Aktivierung des Gardos-Kanals durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen wurde zuvor schon erwähnt. Durch Aktivierung des Gardos-Kanals kommt es zu einem Volumenausstrom aus den Erythrozyten (siehe Abschnitt „Verformbarkeit und Volumen“).

Beim physiologischen Altern der Erythrozyten *in vivo* lassen sich ähnliche Vorgänge beobachten. Mit zunehmenden Lebensalter der Erythrozyten nimmt die Aktivität des Ca^{2+} -Transporters kontinuierlich ab (217). Auch *in vivo* aktivieren die sich dadurch erhöhenden intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ab einer bestimmten Schwelle den Gardos-Kanal. Es kommt zu einem Volumenverlust aus den Erythrozyten. Dieser Volumenverlust und die kontinuierliche Abscherung von Vesikeln im Laufe ihrer Lebensspanne führen höchstwahrscheinlich dazu, dass sich bei alten Erythrozyten ein geringeres Zellvolumen und eine höhere Dichte beobachten lassen (217). Das Lebensende der Erythrozyten ist durch eine Besonderheit gekennzeichnet. In der terminalen Lebensphase der roten Blutzellen kommt es vermutlich durch die stetig weiter ansteigenden Ca^{2+} -Konzentrationen und durch die Dehydrierung der Zellen zur Aktivierung der schwach selektiven Na^{+} -Kationenleitungsbahn „Pcat“. Der hierdurch induzierte Na^{+} -Einstrom in die Zellen überschreitet die Transportkapazität der $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase, sodass es dem osmotischen

Gradienten folgend zu einem Wassereintritt in die Zellen kommt, d. h. in der terminalen Phase des Erythrozytenlebens nimmt das Zellvolumen wieder zu und die Dichte ab (217).

5.6.2.6. Verformbarkeit und weitere Veränderungen an der Zellmembran

Die Flexibilität der Zellmembran kann durch eine nichtenzymatische Glykosylierung von bestimmten Spektrin-Wiederholungen mit Glukose und Ribose eingeschränkt werden. Einige der dreifach-helikalen Spektrin-Wiederholungen, insbesondere in der β -Kette des Spektrins, enthalten Lysin-Gruppen mit einem proximalen Arginin. Es zeigte sich, dass die Spektrin-Wiederholungen, welche Lysin-Gruppen und Arginin enthalten, potentiell glykosyliert werden können und dadurch interhelikale Querverbindungen ausbilden, sodass es zu einer Versteifung des Membranskeletts und zu einer Abnahme der Membranflexibilität kommt. Insbesondere können diejenigen Spektrin-Wiederholungen mit Lysin-Gruppen und Arginin von einer Glykosylierung betroffen werden, welche normalerweise PS binden (siehe Abschnitt „Verformbarkeit und intrazelluläres Ca^{2+} “). Eine Glykosylierung der Spektrin-Wiederholungen kann jedoch nur erfolgen, sofern die Bindung mit PS aufgehoben ist. Durch eine Externalisierung von PS aus dem inneren Blatt der Lipiddoppelschicht in das äußere Blatt verringern sich die PS-Bindungsoptionen. Die Glykosylierung der Spektrin-Wiederholungen wird so erleichtert (233).

Eventuell verliert die Zellmembran auch durch Veränderungen von lipid-rafts an Stabilität (204, 306).

Des Weiteren begünstigen niedrige pH-Werte die Protonierung von negativ geladenen Membranskelettproteinen. Dieses kann zu einer erhöhten Rigidität der Membran führen (24).

Vermutlich trägt der Verlust von Cholesterol aus der Zellmembran zu der Abnahme der Verformbarkeit mit bei. Cholesterol gelangt zum Teil mit Abscherung der Vesikel aus der Erythrozytenmembran. Daneben gibt es wahrscheinlich noch andere Mechanismen, durch die sich die Menge von Cholesterol während der Lagerung in der Erythrozytenmembran reduziert (149).

5.6.2.7. Verformbarkeit und Membranfluktuationen

Zellmembranfluktuationen lassen sich bei unterschiedlichen Zelltypen von Säugetieren beobachten. Dabei handelt es sich um kleinste Fluktuationen der Zellmembran in einer

Frequenz zwischen 0,2 und 30 Hz (216, 357). Bhaduri et al. konnten mit Hilfe der „spatial light interference microscopy“ (SLIM), eine Methode, die auf der „quantitative phase imaging“ (QPI) beruht, beobachten, dass die Membranfluktuationen von gelagerten Erythrozyten über eine sechswöchige Lagerungszeit abnehmen und die Erythrozyten zunehmend rigider wurden (56). Tuvia et al. beobachteten eine direkte Korrelation zwischen der Frequenz der Membranfluktuationen und der Filtrierbarkeit der Erythrozyten durch Mikroporenfilter, d. h. eine Reduktion der Membranfluktuationen ging mit einer Abnahme der Filtrierbarkeit einher (357, 358). Die Membranfluktuationen beruhen zum einen auf thermisch erzeugten Undulationen der Zellmembran, zum anderen scheinen sie möglicherweise metabolischer Energie in Form von ATP zu bedürfen. Levin und Korenstein beobachteten mittels Dunkelfeldmikroskopie, dass Membranfluktuationen in einem großen Umfang von intrazellulären MgATP-Konzentrationen abhängig zu sein scheinen (216, 357). Betz et al. sahen ebenfalls eine Abhängigkeit der Fluktuationen von ATP (53). In ATP-depletierten Erythrozyten beobachteten Tuvia et al. einen Rückgang der Amplitude der Zellmembranfluktuationen (357). Möglicherweise erfolgt die ATP-abhängige Stimulierung der Zellmembranfluktuationen über eine ATPase, welche auf dem kurzen Aktin-Filament lokalisiert ist (357). Evans et al. konnten hingegen keinen Einfluss von ATP auf die Zellmembranfluktuationen beobachten (122).

5.6.2.8. Verformbarkeit und Formveränderungen der Erythrozyten

Während der Blutlagerung verformen sich Erythrozyten zu Echinozyten und zu Sphärozyten. Die Umwandlung in Echinozyten ist zunächst reversibel. Echinozyten (Stechapfelzellen, von griechisch ἐχῖνος = Igel) sind durch eine Oberfläche mit spitzen Ausbuchtungen (Protrusionen und Spikula) gekennzeichnet. Ein Teil der Echinozyten verformt sich im weiteren Verlauf irreversibel zu Sphärozyten (von griechisch σφαῖρος = Kugel) (50, 65, 74, 167, 175, 199, 206, 219, 297, 349). Auch unter physiologischen Bedingungen enthält das Blut von normalen und gesunden Spendern anteilig Echinozyten (ca. 3,5 %) und Sphärozyten (ca. 0,5 %) (50).

Verschiedene Ursachen scheinen für die Formveränderung verantwortlich zu sein. Hierzu zählen die Abscherung von Vesikeln mit Veränderung des Verhältnisses von Zelloberfläche-zu-Zellvolumen sowie möglicherweise Veränderungen der intrazellulären ATP-Konzentration der Erythrozyten. Zudem hängt die Erythrozytenform vom pH-Wert ab, jedoch ist dieses nur relevant für pH-Bereiche unterhalb von 6,4 und oberhalb von 7,7 (161, 187).

Der Verlust der diskoiden Erythrozytenform scheint mit einer Abnahme der Verformbarkeit einherzugehen (87). So beobachteten La Celle sowie Chabanel et al. bei Echinozyten und Sphärozyten mittels Mikropipettenuntersuchungen eine verminderte Verformbarkeit im Vergleich zu diskoiden Zellformen (77, 206). Während der Lagerung von nicht-leukozytendepletierten Erythrozyten in SAG-M fanden Berenzia et al., dass in der zweiten Lagerungswoche die Anzahl von abnormal geformten Erythrozyten signifikant zugenommen hatte (42,6 %, $p < 0,01$). Mit dem 42. Lagerungstag waren 76 % der Erythrozyten zu Echinozyten und Sphärozyten umgewandelt. Einhergehend registrierten sie mittels Mikroporenfiltration eine Abnahme der Verformbarkeit. Lineare Regressionsanalysen ergaben eine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an abnormal geformten Zellen und dem Verformbarkeitsindex ($r = -0,81$, $p = 0,026$) (50).

Im Gegensatz zu den vorgenannten Gruppen konnten hingegen Féo und Mohandas unter Verwendung der Ektazytometrie keine verminderte Verformbarkeit bei Echinozyten registrieren (125).

Untersuchungen von Bhaduri et al. mit der „spatial light interference microscopy“ (SLIM) ergaben, dass auch Erythrozyten, welche ihre diskoidale Zellform über eine sechswöchige Lagerung beibehielten, über diese Zeit kontinuierlich steifer wurden. Dieses war begleitet von einer Abnahme der Membranfluktuationen (56).

5.6.2.9. Vergleich mit anderen Untersuchungsgruppen

Wie eingangs erwähnt, fanden sich teilweise deutliche Unterschiede bei den Verformbarkeitsbestimmungen zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen, wobei die Mehrzahl der Studiengruppen eine Abnahme der Verformbarkeit während der Lagerung oder des Blutverarbeitungsprozesses registrierte (49, 84, 105, 138, 180, 237, 301). In den westlichen Industrienationen hat sich die Blutkomponentenspende durchgesetzt, d. h. es werden Erythrozytenkonzentrate gewonnen, welche in additiven Lösungen (z. B. SAG-M, AS) konserviert werden. Die vorliegende ABC-Studie ist die bisher einzige Studie, die nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft und mit einer ausreichenden Studiengröße die rheologischen Eigenschaften von gelagertem Vollblut über einen längeren Zeitraum untersuchte.

Bennett-Guerrero et al. untersuchten in AS-3 gelagerte, leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate (49). Die Verformbarkeitsbestimmungen erfolgten mit dem LORCA™. Über den Lagerungszeitraum von 42 Tagen fand sich eine kontinuierliche

Abnahme der Verformbarkeit. Bereits in den ersten 96 Stunden der Lagerung war eine signifikante Abnahme der Verformbarkeit zu beobachten. Dabei zeigte sich die Verminderung des EI bei Scherspannungen von 3 Pa leicht ausgeprägter ($p < 0,0001$) als bei 30 Pa ($p = 0,0014$) (49). Auch in der vorliegenden ABC-Studie fand sich eine kontinuierliche Abnahme des Verformbarkeitsindex, welche sich in einem Scherspannungsbereich von 3 bis 5,3 Pa am deutlichsten zeigte (189). Der Umfang der Studie von Bennett-Guerrero et al. umfasste das Blut von 15 verschiedenen Individuen.

Relevy et al. registrierten bei in CPD gelagerten, nicht-leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten über 28 Tage eine kontinuierliche Abnahme der Verformbarkeit, diese zeigte sich ab dem 14. Lagerungstag signifikant ($p = 0,03$). Die Verformbarkeitsuntersuchungen führten Relevy et al. an einem selbst entwickelten „cell flow properties analyzer“ (CFA) durch. Bedauerlicherweise machten Relevy et al. keine Angaben zur Studiengröße (301).

Cluitmans et al. fanden während der Lagerung von leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten in SAG-M über fünf Wochen keine Abnahme der Verformbarkeit (bestimmt mit dem LORCA™). Jedoch zeigte sich der Verformbarkeitsindex in der ersten Lagerungswoche signifikant erniedrigt im Vergleich mit dem Verformbarkeitsindex der Erythrozyten, welche direkt nach der Blutspende aus noch nicht weiterverarbeitetem Vollblut gewonnen wurden (84).

Die gute Bewahrung der Verformbarkeit während der Lagerungszeit bei der Untersuchung von Cluitmans et al. (84) würde vermuten lassen, dass die Verformbarkeit von in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten besser bewahrt wird als bei in CPDA-1 gelagertem Vollblut, wie in der vorliegenden ABC-Studie. Farges et al. beobachteten bei in SAG-M gelagerten, nicht-leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten über vier Wochen ein konstantes Verformbarkeitsverhalten (bestimmt mit einem Zellelastometer) (124). In der fünften Woche zeigte sich jedoch ein signifikanter Abfall der Verformbarkeit. Ebenfalls beobachteten Friedlander et al. mit einem „cell transit analyzer“ bei Erythrozytenkonzentraten über vier Wochen eine konstante Verformbarkeit und mit der fünften Lagerungswoche eine Verminderung der Verformbarkeit (138). Friedlander et al. schlossen jedoch lediglich zehn Proben in ihrer Studie ein und erteilten keine Angaben bezüglich des Konservierungsmediums und ob die Erythrozytenkonzentrate leukozytendepletiert waren.

Im Gegensatz zu Cluitmans, Farges und Friedlander registrierten Mansouri et al. bei in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten einen kontinuierlichen Abfall der Verformbarkeit während der Blutlagerung (237). Mansouri et al. führten keine Leukozytendepletion durch. Zudem verwendeten sie zur Verformbarkeitsbestimmung Mikroporenfilter. Mikroporenfilter sind sehr sensitiv gegenüber einer Veränderung des Verhältnisses von Oberfläche-zu-Volumen, jedoch weniger sensitiv gegenüber einer veränderten internen Viskosität (251). Ein Nachteil der Filter besteht darin, dass diese sehr anfällig gegenüber einer artifiziellen Verlegung der Poren sind, was die Ergebnisse verfälschen kann.

Ebenso beobachteten Almizraq et al. bei in SAG-M über 49 Tage gelagerten leukozyten-reduzierten Erythrozytenkonzentraten eine Abnahme des EI (Studiengröße 30 Einheiten). Die Verformbarkeitsmessungen erfolgten mit dem LORCA™, was einen direkten Vergleich mit der Studie von Cluitmans ermöglicht (5). Auch Izzo et al. haben bei in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten eine kontinuierliche Abnahme der Verformbarkeit während der Lagerungszeit gemessen (Verformbarkeit mit dem LORCA™ bestimmt) (180). Der Umfang der Untersuchung von Izzo et al. umfasste lediglich drei Proben, weshalb die Ergebnisse dieser Studie jedoch kritisch zu hinterfragen sind.

Henkelman et al. fanden bei leukozytendepletierten und in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten ein inkonstantes Verhalten der Verformbarkeit über sieben Lagerungswochen (bestimmt mit dem LORCA™). Sie beobachteten bei Scherspannungen von 3,9 Pa zunächst eine Zunahme der Verformbarkeit, d. h. eine Erhöhung des EI. In der dritten Woche kam es zu einer leichten Abnahme, in der fünften Woche zu einer Zunahme und mit der siebten Woche zeigte sich eine erneute Abnahme der Verformbarkeit, wobei der EI in der siebten Woche annähernd dem Ausgangs-EI an Tag null glich. Bei Scherspannungen von 50 Pa konnten Henkelman et al. eine kontinuierliche Abnahme der Verformbarkeit über vier Lagerungswochen beobachten, jedoch zeigte sich auch bei Scherspannungen von 50 Pa eine leichte Zunahme der Verformbarkeit mit der fünften Lagerungswoche, welche jedoch nicht über der Ausgangs-EI lag (161). Henkelman et al. bestimmten keinen gemittelten EI, was einen Vergleich mit den anderen Gruppen erschwert. In der vorliegenden ABC-Studie erniedrigte sich der EI sowohl in dem Scherspannungsbereich von 3 bis 5,3 Pa als auch bei 30 Pa kontinuierlich. Bei Scherspannungen von 3 bis 5,3 Pa zeigte sich die Abnahme am deutlichsten. Bezüglich der

entsprechenden Daten sei an dieser Stelle freundlicherweise auf die Publikation: Karger et al. (2012) verwiesen (189).

Möglicherweise sind die inkonstanten Ergebnisse von Henkelman et al. auf die geringe Studiengröße von lediglich zehn Proben zurückzuführen. Methodisch sind die Verformbarkeitsbestimmungen mit dem LORCA™ gut reproduzierbar und die Standardabweichungen sehr gering (154, 373).

Ebenfalls inkonstante Werte der Verformbarkeit beobachteten Berenzia et al. bei über 42 Tage in AS gelagerten, nicht-leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten. Die Verformbarkeitsbestimmungen erfolgten mit Mikroporenfiltern. Berenzia et al. fanden eine signifikante Abnahme der Verformbarkeit zwischen dem 7. und dem 14. Lagerungstag ($p < 0,01$). Am 28. Lagerungstag beobachteten sie eine leichte Verbesserung, wobei die Verformbarkeit immer noch deutlich unterhalb der Messwerte von der ersten Messung lag. Einen weiteren stärkeren Abfall konnten sie mit dem 35. Lagerungstag registrieren ($p < 0,01$ vs. 28. Lagerungstag). Am 42. Lagerungstag zeigte sich jedoch wieder eine Erhöhung der Verformbarkeit ($p < 0,01$ vs. 35. Lagerungstag). Diese sehr schwankenden Ergebnisse, einhergehend mit einer teilweise recht großen Standardabweichung (14. Lagerungstag: SD 20,5; 21. Lagerungstag: SD 23,3 und 42. Lagerungstag: SD 14,0), sind möglicherweise auf die ungenauere Methode der Mikroporenfilter zurückzuführen. Die Fallzahl der Studie von Berenzia et al. war mit neun Spendern sehr gering. Die Untersuchungen begannen mit dem fünften Lagerungstag, d. h. es wurde kein Ausgangswert bei Sammlung des Blutes erhoben (50).

Der bei Cluitmans et al. (84) auffällige signifikante Unterschied zwischen den aus dem Vollblut nach der Spende gewonnen Erythrozyten und den weiterverarbeiteten Erythrozyten nach der ersten Lagerungswoche, könnte durch den Weiterverarbeitungsprozess der Erythrozyten bedingt sein. Bedauerlicherweise veröffentlichten Cluitmans et al. in ihrer Publikation keine näheren Informationen bezüglich des Verarbeitungsprozesses der Erythrozytenkonzentrate, noch gaben sie die Fallzahl ihrer Studie an.

Matthes et al. beobachteten bei den über das Apheresesystem MCS 3P® gewonnenen und in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten mittels einer Gravitationsfiltrationsmethode über die ersten vier Wochen der Lagerung sogar ein verbessertes Verformbarkeitsverhalten im Vergleich zu vor der Blutspende. Erst mit dem 42.

Lagerungstag zeigte sich eine verminderte Verformbarkeit (240). Denkbar wäre, dass die Kombination einer schonenderen Blutabnahme mit kontinuierlicher Zuführung der Antikoagulanzlösung, Leukozytendepletion sowie Verwendung der Konservierungslösung SAG-M zu einer besseren Bewahrung der Verformbarkeit führen könnte. Einige Konservierungsmedien können ein osmotisch bedingtes Schwellen der Zellen bedingen, was die eigentliche Volumenverminderung (Membranverlust) der Erythrozyten während der Lagerung maskiert. Turner et al. inkubierten mehr als 21 Tage in CPDA-1 gelagerte Erythrozyten in autologem Plasma und fanden nach einer 24 stündigen Inkubationszeit ein Schrumpfen der Zellen. Einhergehend zeigte sich eine Verminderung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten (83, 356).

Die Diskrepanzen der Beobachtungen in den Studien sind möglicherweise auf methodische Ungenauigkeiten (z. B. Verwendung von Mikroporenfiltern) und unzureichende Studiengrößen/Fallzahlen zurückzuführen.

5.6.2.10. Einfluss von ATP auf die Verformbarkeit und die Form der Erythrozyten

Seit langer Zeit wird über den Einfluss der intrazellulären ATP-Konzentration auf die Verformbarkeit der Erythrozyten und auf deren Form, sowie auf das Überleben der Erythrozyten im Empfängerorganismus nach ihrer Transfusion kontrovers diskutiert. Es zeigte sich, dass das Posttransfusionsüberleben transfundierter Erythrozyten im Empfängerorganismus mit der intrazellulären ATP-Konzentration assoziiert ist (siehe Kapitel „Posttransfusionsüberleben“).

Nachdem Nakao Ende der 1950er Jahre erstmals eine Korrelation zwischen der intrazellulären ATP-Konzentration der Erythrozyten und der Erythrozytenform beschrieb (258), folgte eine große Anzahl von Untersuchungen. Allgemein fand sich infolge einer ATP-Depletion eine Formveränderung zu Echinozyten (77). Dabei unterschieden sich die jeweiligen Studien in dem zeitlichen Ablauf der Formveränderung als auch in Bezug auf die gemessene ATP-Konzentration, bei welcher eine Formveränderung auftrat. Einige Studien sollen hier in Kürze wiedergegeben werden.

Nakao beobachtete infolge einer künstlich induzierten ATP-Depletion eine Formveränderung von diskoiden Erythrozyten zu Echinozyten. Indem die ATP-depletierten Zellen mit Glukose, Inosin und Adenin-Sulphat inkubiert wurden, konnten sie ihren ATP-Gehalt regenerieren. Infolge der Inkubation (Rejuvenation), genauer gesagt zwei Stunden

nach Beginn der Inkubation, erlangten die zuvor zu Echinozyten umgewandelten Zellen ihre diskoide Form wieder. Der Vorgang konnte von Nakao mehrfach wiederholt werden (258).

Scheetz und Singer erreichten bei zu Echinozyten verformten ATP-depletierten Erythrozyten-Ghosts nach Inkorporation von MgATP eine Wiedererlangung der diskoiden Form (318). Ghosts sind hämolysierte Erythrozyten ohne zytoplasmatischen Inhalt.

Féo und Leblond beobachteten während einer zwölf Stunden andauernden ATP-Depletion von Erythrozyten ebenfalls eine Formveränderung von diskoiden Zellen zu Echinozyten. Als die intrazelluläre ATP-Konzentration während dieses Depletionsprozesses auf unter 50 % ihres Ausgangswertes abgefallen war, konnte ein zunehmendes Auftreten von Echinozyten registriert werden. Nach zwölf Stunden hatten sich 90 bis 100 % aller Erythrozyten zu Echinozyten umgewandelt. Die ATP-depletierten Echinozyten wurden anschließend von Féo und Leblond in einer Suspension aus Glukose, Inosin und Adenin inkubiert, worauf sich der intrazelluläre ATP-Gehalt wieder erhöhte und die Echinozyten ihre diskoide Zellform wiedererlangten. Dabei zeigten sich sämtliche Erythrozyten bei einer ATP-Konzentration von $0,45 \mu\text{mol/ml}$ zu Diskozyten umgewandelt. Während des vorausgegangenen Depletionsprozesses lagen bei einer intrazellulären ATP-Konzentration von $0,45 \mu\text{mol/ml}$ bereits 15 bis 20 % Echinozyten vor. In einer Ausweitung der Versuche konnte durch Inkubation von Erythrozyten in einer Suspension aus Glukose, Inosin, Adenin und Phosphat eine dreifache Erhöhung der normalen ATP-Konzentration erzielt werden. Diese so supranormal mit ATP angereicherten Erythrozyten wurden anschließend ebenfalls ATP-depletiert. Dabei zeigte sich eine deutlich schnellere Umwandlung der Diskozyten in Echinozyten. Mit Abfall der ATP-Konzentration unter $0,5 \mu\text{mol/ml}$ waren bereits 75 % der Erythrozyten zu Echinozyten umgewandelt (126). Diese Beobachtungen zeigen, dass es keinen konstanten, direkten Zusammenhang zwischen der intrazellulären ATP-Konzentration und der Form der Erythrozyten geben kann, sondern dass dieser eher inkonstant und indirekt sein muss.

Auch Ferrell und Huestis konnten eine Formveränderung von Erythrozyten infolge einer ATP-Depletion beobachten. Diese Formveränderung ereignete sich aber nicht direkt bei einer bestimmten ATP-Konzentration, sondern erst fünf bis sieben Stunden nach Abfall der ATP-Konzentration (129).

In einer anderen Studie beobachteten Féo und Mohandas (125): 1., dass bei gleichen intrazellulären ATP-Konzentrationen Erythrozyten eine unterschiedliche Morphologie

aufweisen können. 2., dass es infolge einer ATP-Depletion zu einer Formveränderung kommt, diese sich aber nicht zeitgleich mit dem Abfall der ATP-Konzentration ereignet. 3., dass auch vollständig ATP-depletierte Zellen mit Zusatz von Iod-Acetat und Glukose eine diskoidale Form über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten können (125).

Im Gegensatz zu Echinozyten persistiert eine große Anzahl von Sphärozyten bei wiederhergestellten physiologischen ATP-Konzentrationen (106, 349, 389).

Mit dem Verlust der diskoiden Erythrozytenform beobachteten einige Untersuchungsgruppen auch eine Abnahme der Verformbarkeit (50, 77, 206). Dabei besteht die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der intrazellulären ATP-Konzentration und der Verformbarkeit der Erythrozyten gibt. Weed et al. fanden mittels Filtrations- und Mikropipettenuntersuchungen, dass Erythrozyten mit einer erniedrigten intrazellulären ATP-Konzentration eine verminderte Verformbarkeit sowie eine erhöhte Rigidität der Zellmembran aufweisen (375). Ebenso beobachteten Baker et al. mit Filtrationsuntersuchungen und Chabanel et al. mit Mikropipettenuntersuchungen eine verminderte Flexibilität von ATP-depletierten Erythrozyten (20, 77).

Im Gegensatz hierzu konnte die Gruppe um Meiselman et al. keine statistisch relevante Korrelation zwischen der Verformbarkeit (bestimmt mittels Mikropipetten) und der ATP-Konzentration von Erythrozyten feststellen (247).

In der vorliegenden ABC-Studie fand sich eine signifikante Assoziation zwischen der ATP-Konzentration und der Verformbarkeit bei hohen Scherspannungen und sofern die ATP-Konzentration unter $2,5 \mu\text{mol/g Hb}$ abgefallen war. Dieses war ab der sechsten Lagerungswoche zu beobachten. Bezüglich der entsprechenden Daten sei an dieser Stelle freundlicherweise erneut auf die Publikation: Karger et al. (2012) verwiesen (189).

Bei der Interpretation dieser teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse ist zu bedenken, dass in vielen dieser Studien eine spezielle Präparation der Erythrozyten erfolgte, indem sie z. B. mehrfach gewaschen und in verschiedenen Medien inkubiert wurden (125, 126, 375) oder Untersuchungen an Erythrozyten-Ghost erfolgten (318). Fraglich ist, inwiefern diese Prozeduren die Eigenschaften der Erythrozyten selbst beeinflussen.

Unter Betrachtung der diskrepanten Ergebnisse infolge einer ATP-Depletion und ATP-Rejuvenation, scheint keine direkte/absolute Korrelation zwischen dem intrazellulären

ATP-Gehalt der Erythrozyten und sowohl ihrer Form als auch ihrer Verformbarkeit zu bestehen. Formveränderungen von Diskozyten zu Echinozyten, als auch eine Verminderung der Verformbarkeit scheinen als Folge – zeitlich verzögert – zu einer ATP-Depletion aufzutreten (125). Wie zuvor beschrieben, sind zahlreiche Zellfunktionen von ATP als Energieträger abhängig. Hierzu gehören u. a. die Kationentransporter der Zellmembran, die Translokasen zur Aufrechterhaltung der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide in der Lipiddoppelschicht, Membranfluktuationen als auch die Phosphorylierung bestimmter Membranproteine wie Spektrin und Protein 4.1. Infolge einer Dephosphorylierung von Spektrin kommt es vermutlich zu einer Erhöhung der Rigidität der Membran und einer Abnahme der Verformbarkeit. Möglicherweise werden die Membranproteine bis zu einem bestimmten Schwellenwert der ATP-Konzentration normal phosphoryliert. Die Dephosphorylierung läuft eventuell verzögert ab und signifikante Veränderungen der Flexibilität der Zellmembran treten gegebenenfalls erst auf, sofern eine bestimmte Anzahl von Membranproteinen dephosphoryliert ist. Möglicherweise hat eine Depletion von ATP keinen direkten Effekt auf die Verformbarkeit, sollte die Dephosphorylierung von Spektrin noch nicht eingetreten sein (259). Dieses würde die von einigen Untersuchern registrierte Zeitverzögerung zwischen der Verminderung der ATP-Spiegel und der Formveränderung bzw. der Abnahme der Verformbarkeit erklären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ATP kein valider Surrogatmarker für die Erythrozytenverformbarkeit ist.

5.6.3. Verformbarkeit und Strömungsverhalten

Die Erythrozyten können mit einer Größe zwischen 7,5 und 8,5 μm (253, 277, 292) Gefäße bis zu einem Durchmesser von 2,8 μm passieren (354). Um hierzu befähigt zu sein, verfügen sie über ihre exzellente Verformbarkeit. Daneben sind die Verformbarkeits-eigenschaften der Erythrozyten wichtig für die Stabilisierung des Blutströmungsprofils. Hierzu zählt die Fähigkeit, sich in der Strömung zu Ellipsen auszudehnen, sowie die Eigenschaft der Zellmembran, um das Zytoplasma zu rotieren – das sogenannte „tank-treading“. Eine Abnahme der Verformbarkeit wirkt sich direkt auf den Strömungswiderstand und auf die Perfusion von Organen aus. Der Einfluss der Erythrozytenverformbarkeit auf den hämodynamischen Widerstand variiert deutlich zwischen der Abfolge der Gefäße (223).

Bei Eintritt der Erythrozyten in ein Blutgefäß der Mikrozirkulation kommt es zu einer Zunahme des Strömungswiderstandes. Das Ausmaß dieser Zunahme ist von der Verformbarkeit abhängig, bei einer eingeschränkten Verformbarkeit erhöht sich der Widerstand. Insbesondere ist in Blutgefäßen mit einem der Erythrozytengröße ähnlichem Durchmesser die Verformbarkeit die bestimmende Größe des Strömungswiderstandes (34).

Bei Strömungs- und Perfusionsuntersuchungen in Geweben der Mikrozirkulation zeigte sich, dass künstlich verhärtete Erythrozyten eine längere Passagezeit durch das Gefäßsystem benötigen. Zudem bedarf es eines erhöhten Blutdruckes, um die Strömung aufrechtzuerhalten (223, 319, 348). Dabei scheint der Grad der Verformbarkeit von besonderer Bedeutung zu sein. Lipowsky et al. untersuchten das Strömungsverhalten von zu unterschiedlichen Stärken mit Glutaraldehyd verhärteten Erythrozyten. Im Vergleich zu normalen Erythrozyten passierten die in ihrer Verformbarkeit gering eingeschränkten Erythrozyten das kapilläre Netzwerk nur mit einer leichten Behinderung, die Passagezeit war gering verlängert. Diese leicht verhärteten Zellen waren aber in der Lage, alternative Passagewege zu generieren, d. h. Shuntverbindungen auszubauen. Bei der Fraktion mit der stärksten Verminderung der Verformbarkeit kam es zu einer deutlichen Verlängerung der Passagezeit. Zudem waren diese stark verhärteten Zellen nicht mehr in der Lage, alternative Passagewege auszubilden (223).

Vermutlich kann es bei einer stark eingeschränkten Verformbarkeit zu einem Steckenbleiben, einer Sequestrierung der Erythrozyten in sehr kleinen Blutgefäßen kommen (223, 319). So zeigte sich in Tierexperimenten eine verstärkte Sequestrierung von mit Glutaryldehyd verhärteten Erythrozyten in der Milz, aber auch der Leber, der Lunge und dem Sternum (83, 323). Unter Verwendung eines „spleen-mimicking device“, welcher der physiologischen Struktur der Milz nachgebildet ist (105), fanden Cluitmans et al., dass mit voranschreitender Lagerungszeit die Anzahl von Erythrozyten abnimmt, welche diese Vorrichtung passieren können (84).

Weniger verformbare Erythrozyten begünstigen und verstärken eine Marginalisierung von Leukozyten und Thrombozyten an den Rand der Blutströmung, d. h. in die Nähe des Gefäßendothels (2). Die Marginalisierung von Thrombozyten begünstigt prokoagulatorische Prozesse. Auch steifere, weniger verformbare Erythrozyten, wie malaraiinfizierte Erythrozyten, zeigen selbst eine erhöhte Marginalisierung in Richtung der Gefäßwände (174).

Insbesondere wirkt sich eine eingeschränkte Verformbarkeit unter extrem anämischen Bedingungen auf die mikrovaskuläre Funktion aus. Cabrales et al. führten an einem Hamster-Fenster-Kammer-Modell Perfusionsuntersuchungen durch. Dabei verwendeten sie zum einen frische, normale Erythrozyten, zum anderen künstlich mittels Glutaryldehyd verhärtete Erythrozyten. Nachdem bei den Hamstern künstlich eine Anämie erzeugt wurde (Hkt 18 %), erfolgte die Perfusion mit den unterschiedlich stark verformbaren Erythrozyten. Bei Perfusion mit den eingeschränkt verformbaren Erythrozyten konnte eine verminderte mikrozirkulatorische Strömung, eine eingeschränkte FCD (functional capillary density, funktionale kapilläre Dichte) und eine reduzierte Oxygenierung der Gewebe beobachtet werden. Die FCD beschreibt die Anzahl von Kapillaren in einer definierten Geweberegion, welche von Erythrozyten durchflossen werden. Sie ist von Bedeutung für die Perfusion von Geweben und die Diffusionsdistanz von O₂, Nahrungsstoffen und Abfallprodukten zwischen dem Blut und den Geweben (72, 355).

Die jeweils einzelnen Organe scheinen zudem unterschiedlich auf eine veränderte Erythrozytenverformbarkeit zu reagieren. So ist z. B. die Niere sehr sensitiv gegenüber einer eingeschränkten Verformbarkeit (154).

In der ABC-Studie zeigte sich die Abnahme der Verformbarkeit bei Scherspannungen von 3 bis 5,3 Pa am deutlichsten (189). Dieses mag sich insbesondere auf das Strömungsverhalten in der Mikrozirkulation auswirken, da dort überwiegend Scherspannungen zwischen 3 und 5 Pa vorherrschen (284).

In größeren Gefäßen nimmt die Verformbarkeit der Erythrozyten Einfluss auf die scheinbare Viskosität des Blutes. Mit zunehmender Schergeschwindigkeit richten sich die roten Blutzellen in der Strömung aus und reduzieren so effektiv die Partikelgröße und den friktionalen Widerstand untereinander (25). Durch eine Reduzierung ihrer Verformbarkeit sind die Erythrozyten in der Ausbildung ihrer Ellipsenform und im „tank-treading“ eingeschränkt, die Orientierung der Erythrozyten in der Blutströmung wird erschwert. Yalcin et al. beobachteten tierexperimentell nach Transfusion von Rattenerythrozyten, welche für 14 Tage in CPDA-1 gelagert wurden, eine Abnahme der parallel zur Gefäßwand fließenden Erythrozyten und eine Zunahme des „tumblings“, d. h. des Taumelns der roten Blutzellen in der Blutströmung (391). Infolge der Verminderung der Erythrozytenverformbarkeit kommt es zu einer Erhöhung der Blutviskosität, so führt eine künstliche Verhärtung der Erythrozyten zu einer fast vollständigen Unabhängigkeit der Viskosität von der Scherungsgeschwindigkeit (60).

Leichte Veränderungen der rheologischen Eigenschaften werden schnell von den Mechanismen der mikrozirkulatorischen Autoregulation oder durch Steigerung des HZVs ausgeglichen. Einer Erhöhung des Strömungswiderstandes wird z. B. kompensatorisch mit einer Relaxierung der glatten Gefäßmuskulatur begegnet. So zeigte sich, dass die Perfusion von mit Glutaraldehyd verhärteten Erythrozyten bei Präparaten von Ratten bis zu einer 78 %igen Erhöhung des Strömungswiderstandes führte. Eine zusätzliche Inhibierung der glatten Gefäßmuskulatur mit Papaverin steigerte den Strömungswiderstand um 250 % (34). Vor diesem Hintergrund kann man nach dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht eindeutig sagen, inwiefern die „relativ geringe“ Abnahme der Verformbarkeit während der Lagerungszeit hämorheologisch relevante Auswirkungen aufweist. Sollten jedoch die Autoregulationsmechanismen im Empfängerorganismus durch einen pathologischen Zustand, z. B. durch Arteriosklerose, ausgeprägte Herzinsuffizienz, geschädigt sein, könnten eine verminderte Verformbarkeit und eine erhöhte oder verminderte Aggregation pathologisch relevante Auswirkungen zeigen.

Potentiell schädliche Auswirkungen einer eingeschränkten Erythrozytenverformbarkeit auf den Empfängerorganismus sind sehr wahrscheinlich von der Menge des transfundierten Blutes abhängig. Frank et al. beobachteten, dass Erythrozyten, die von Patienten nach der Transfusion von mehr als fünf Erythrozytenkonzentraten gewonnen wurden, gegenüber Erythrozyten von Patienten, welche weniger als vier Erythrozytenkonzentrate transfundiert bekamen, eine signifikant geringere Verformbarkeit zeigten. Diese verminderte Verformbarkeit der Empfängererythrozyten war noch für mindestens drei Tage nach erfolgter Transfusion nachzuweisen (136).

Salara et al. verglichen bei herzchirurgischen Patienten die Auswirkungen unterschiedlicher Transfusionsregime auf die rheologischen Eigenschaften der Empfängererythrozyten. In den drei verschiedenen Untersuchungsgruppen wurden den Empfänger entweder 1. nur intraoperativ gewonnenes autologes Blut (maschinelle Autotransfusion) transfundiert oder 2. intraoperativ gewonnenes autologes Blut + < fünf allogene Erythrozytenkonzentrate oder 3. intraoperativ gewonnenes autologes Blut + \geq fünf allogene Erythrozytenkonzentrate verabreicht. In der ersten Gruppe, welche lediglich intraoperativ gewonnenes autologes Blut erhalten hatte, zeigte sich am ersten postoperativen Tag keine Veränderung der mit der Ektazytometrie gemessenen Erythrozytenverformbarkeit. In der zweiten Gruppe, (autologes Blut + < fünf Erythrozytenkonzentrate) fand sich eine Abnahme der Verformbarkeit um 6 % am ersten postoperativen Tag, in der dritten Gruppe (autologes

Blut + \geq fünf Erythrozytenkonzentrate) zeigte sich eine Verminderung um 14 %. Die Regenerierung der Verformbarkeit auf ihren Ausgangswert vor der Operation dauerte anschließend bis zu drei Tagen (311).

Bei allen Erkenntnissen, die mit Tierexperimenten gewonnen werden, ist zu bedenken, dass sich die rheologischen Gegebenheiten von Tierspezies nicht direkt auf den humanen Organismus übertragen lassen, z. B. beträgt die Lebenszeit von Rattenerythrozyten durchschnittlich nur 60 Tage, von Hamster- und Mäuseerythrozyten nur 50 Tage. Dementsprechend vollziehen sich auch der Alterungsprozess und die Veränderungen während der Blutlagerung deutlich schneller. Die Lebensfähigkeit der Erythrozyten von Ratten beträgt nach einer Blutlagerung von sieben Tagen lediglich 79 %, nach vier Wochen liegt sie bei 5 %. Ferner sind Erythrozyten von Ratten *in vivo* nicht in der Lage, 2,3-DPG zu synthetisieren (355). Auch mag es Unterschiede in der Struktur und der Autoregulation der Mikrozirkulation von verschiedenen Tierspezies geben.

Die künstliche Verhärtung, z. B. mit Glutaraldehyd oder Diamid führt zu einer äußerst starken Einschränkung der Verformbarkeit, welche die Abnahme der Verformbarkeit unter Lagerungsbedingungen um ein Vielfaches übersteigt. Mit Glutaraldehyd wird selektiv das Membranskelett verändert. So werden bei der Untersuchung von mit Glutaraldehyd-verhärteten Erythrozyten die anderen Komponenten der Verformbarkeit nicht berücksichtigt.

5.6.3.1. Krankheiten mit einer verminderten Verformbarkeit

Eine verminderte Erythrozytenverformbarkeit findet sich beim Myokardinfarkt, bei der Angina pectoris, bei der cerebralen Ischämie, Diabetes mellitus (395), bei einer Sepsis und einem SIRS (138) und möglicherweise auch bei adipösen Menschen (361). Insbesondere weisen bei hämatologischen Erkrankungen wie der Thalassämie, der Sichelzellerkrankung und bei Malaria die betroffenen Erythrozyten eine verminderte Verformbarkeit auf (88, 154, 179, 395).

5.6.4. Aggregation

In der vorliegenden Studie wurde zur quantitativen Bestimmung der Aggregationsstärke der Aggregationsindex (AI) verwendet. Der AI beschreibt die Aggregation bei Stasis, d. h. bei Sistieren der Blutströmung.

Neben der Bestimmung der Erythrozytenaggregation in jeglichem Medium erfolgt in vielen Studien die Messung der Aggregabilität (engl. aggregability). Die Aggregabilität beschreibt die beobachtete oder gemessene Aggregation von gewaschenen und in einer definierten Polymer- oder Proteinlösung suspendierten Erythrozyten verglichen mit Erythrozyten einer anderen Suspension oder Gruppe, welche ebenfalls in der gleichen definierten Polymer- oder Proteinlösung suspendiert sind (32, 36, 246). Der Terminus Aggregabilität wird im Speziellen verwendet, um die intrinsischen, zelleigenen Eigenschaften zu beschreiben und diese von auf die Aggregation einflussnehmenden Faktoren des Plasmas abzugrenzen.

5.6.4.1. Untersuchungsmethoden der Aggregation

Die Aggregation der Erythrozyten lässt sich mit verschiedenen Methoden untersuchen. Hierzu zählen die Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), Zentrifugationsmethoden, mikroskopische Methoden wie die „computerized image analysis“, „low shear viscometry“, Ultraschalldarstellung, „monitoring electrical properties“ sowie die Analyse von Lichttransmissionen oder Lichtreflexionen durch Erythrozytensuspensionen (32).

Der LORCA™ basiert auf dem Prinzip der Syllectometrie, einem Verfahren, das erstmals von Zillstra in den 1950er Jahren beschrieben wurde (399). Ebenfalls auf diesem Prinzip beruht das Myrenne-Aggrometer® (Myrenne GmbH, Roetgen, Deutschland) und der RheoScan-A® (Rheomeditech, Seoul, Korea). LORCA™, Myrenne-Aggrometer® und RheoScan-A® haben sich kommerziell zur Bestimmung der Aggregation etabliert (27). Der Vorteil des LORCA™ gegenüber dem Myrenne-Aggrometer® besteht darin, dass er mit einer Vorrichtung zur Temperaturadjustierung ausgestattet ist. Dieses ist wie bei den Verformbarkeitsmessungen von Vorteil, da die Aggregation der Erythrozyten von der Umgebungstemperatur abhängig ist (28, 108, 151, 152). Untersuchungsergebnisse mit dem LORCA™ zeigten sich gut reproduzierbar (151).

5.6.4.2. Aggregations-Index

Über den Lagerungszeitraum konnte sowohl in der konventionellen Gruppe als auch in der ABC-Gruppe eine Abnahme des Aggregationsindex beobachtet werden. In der konventionellen Gruppe zeigte sich dabei eine deutliche Tendenz zu einer höheren Aggregation, welche bereits bei Lagerungsbeginn bestand. Die Unterschiede im AI zwischen den beiden Gruppen waren in den ersten drei Lagerungswochen am deutlichsten (21. Lagerungstag: $p = 0,03$), nahmen dann im weiteren Verlauf aber ab. Es zeigte sich eine Tendenz zu einer schnelleren Aggregationsbildung in der konventionellen Gruppe.

Verglichen mit anderen Studien in der Literatur finden sich teilweise gegensätzliche Ergebnisse in Bezug auf das Aggregationsverhalten während der Blutlagerung.

Mansuri et al. fanden eine Abnahme der Aggregabilität von Erythrozytenkonzentraten in SAG-M über einen Lagerungszeitraum von 28 Tagen (237). Meyerstein et al. registrierten eine Zunahme der Aggregation bei Lagerung in CPD (248, 249).

Hovav et al. beobachteten bei über 42 Tage in CPDA-1 gelagertem Vollblut (nicht-leukozytendepletiert) keine Veränderung der Aggregation der Erythrozyten in autologem Plasma (175). In ihrer Studie wurden an den einzelnen Untersuchungstagen Erythrozyten gewonnen, diese mehrfach gewaschen und darauf sowohl in autologem Plasma, d. h. in dem Plasma, in welchem sie gelagert wurden, als auch in einer Dextran 500 kDa-Puffer-Lösung sowie in frischem allogenen Plasma suspendiert. Die Messung der Aggregatgröße erfolgte in einer von der Gruppe eigens entwickelten Strömungskammer mit computergesteuerter Bildanalyse. Während die Erythrozyten, welche in autologem Plasma – d. h. mitgelagertem Plasma – suspendiert wurden, keine Veränderung der Aggregatgröße aufwiesen, zeigten sich in der Dextranlösung mit fortschreitender Lagerungszeit zunehmend größer werdende Aggregate. Ebenso beobachteten Hovav et al. bei Suspension in frischem allogenen Plasma eine mit der Lagerungszeit zunehmende Aggregatgröße (175).

Henkelman et al. untersuchten die Aggregation von leukozytendepletierten, über sieben Wochen in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten. Die rheologischen Untersuchungen erfolgten mit dem LORCA™. Nach der ersten Lagerungswoche kam es zu einem signifikanten Abfall des AI von 46,9 (SD 2,4) % auf 41,9 (SD 3,6) % ($p < 0,01$). Dann zeigte sich in der zweiten, dritten und vierten Lagerungswoche eine Erhöhung des AI über 45 %. In der fünften und siebten Lagerungswoche zeigte sich erneut eine leichte,

gegenüber dem Ausgangswert aber signifikante Erniedrigung des AI auf 44,4 (SD 4,5) % und 44,3 (SD 2,2) %. Die Studiengröße umfasste zehn Erythrozytenkonzentrate. Die Aggregation wurde, im Gegensatz zu der vorliegenden ABC-Studie, unter Hinzufügung von Dextran 200 kDa induziert, was vermutlich zu dem höheren AI führte (161).

5.6.4.3. Aggregation und Lebensalter der Erythrozyten

Es gibt zahlreiche Faktoren, die auf die Aggregationsstärke von Erythrozyten Einfluss nehmen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Stärke der Aggregation mit dem Lebensalter der Erythrozyten korreliert. Mit fortschreitender Lebenszeit der roten Blutzellen nimmt deren Dichte u. a. aufgrund des kontinuierlichen Membranverlustes zu. Diese Tatsache lässt sich dazu verwenden, die Erythrozyten nach ihrer Dichte zu separieren und die so gewonnenen Fraktionen in alte, mittelalte und junge Zellen zu klassifizieren. Nach der Fraktionierung im Sedimentationsröhrchen unterteilte Nash diese Fraktionen in TOP, BOT und MID. Die Zellen aus der BOT-Fraktion (bottom) waren die schwersten, d. h. die Zellen mit der größten Dichte, welche sich demnach am längsten in der Zirkulation befanden. Diese Fraktion machte 10 % der Gesamtzellen aus. Die TOP-Zellen (top, ebenfalls 10 %) befanden sich in der obersten Lage, waren die leichtesten und damit die Jüngsten. Der mit 80 % größte Anteil der Zellen wurde durch die MID-Fraktion (middle) repräsentiert (261). Nordt et al. beobachteten, dass die 10 % der dichtesten Erythrozyten (BOT) in autologem Plasma eine mehr als zweifach stärkere Aggregation als die 10 % der am wenigsten dichten Erythrozyten (TOP) aufwiesen (246, 272, 293). Wittingstall et al. fanden ebenfalls ähnliche Ergebnisse einer verstärkten Aggregation der älteren, dichteren Erythrozyten (BOT) in Suspensionen mit neutralen oder negativ geladenen Polymeren. Rampling und Wittingshall registrierten auch in Suspensionen aus humanem Fibrinogen eine erhöhte Aggregation bei dichteren Zellen im Vergleich zu weniger dichten Erythrozyten (293). Aus diesen Beobachtungen lässt sich zusammenfassen, dass die dichtesten Erythrozyten, d. h. die Erythrozyten, welche sich am längsten in der Zirkulation befunden haben (BOT), eine stärkere Aggregation als jüngere Erythrozyten (TOP) aufweisen.

Bezogen auf die Bedingungen der langen Lagerungszeit und der auch unter den Lagerungsbedingungen fortschreitenden Lebenszeit der Erythrozyten in der ABC-Studie, wäre daher eine Zunahme der Aggregation mit fortschreitender Lagerungszeit zu erwarten.

5.6.4.4. Aggregation und Fibrinogen

Ein wesentlicher, für die Aggregation der humanen Erythrozyten essentieller Faktor ist die Anwesenheit von Makromolekülen im Plasma bzw. im suspendierenden Medium. Im humanen Plasma kommt aufgrund seiner molekularen Größe und seiner hohen Konzentration Fibrinogen die größte Bedeutung zu (35, 41, 293). Bei einer erhöhten Plasmakonzentration von Fibrinogen findet sich eine verstärkte Aggregation, d. h. eine Zunahme der Größe und des Zusammenhaltes der Aggregate sowie eine beschleunigte Bildung der Aggregate (35). Dabei besteht eine beinahe lineare Beziehung zwischen der Plasmakonzentration von Fibrinogen und der Aggregatgröße (32). Marton et al. beobachteten eine signifikante Korrelation zwischen der Plasmafibrinogenkonzentration und dem mit dem LORCA[™] bestimmten AI in Vollblut. Die Zunahme der Aggregationsstärke zeigte sich dabei konzentrationsabhängig beschränkt. Bei Fibrinogenkonzentrationen höher als 4,5 g/l fand sich in der Studie von Marton et al. kein weiterer Anstieg des AI (239).

Unter physiologischen Bedingungen liegt die Fibrinogenkonzentration im Blutplasma zwischen 2,0 und 3,5 g/l (112). Während der Lagerungszeit blieben die Fibrinogenkonzentrationen in der konventionellen Gruppe und in der ABC-Gruppe mit 2,4 g/l annähernd konstant, sodass sich keine Korrelation zwischen der abnehmenden Aggregationsstärke und der Fibrinogenkonzentration zeigte.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der ABC-Studie beobachteten Hovav et al. eine Abnahme der Fibrinogenkonzentration bei über 42 Tage in CPDA-1 gelagerten Vollblutkonserven (175). Während der Lagerungszeit blieb in der Studie von Hovav der AI in autologem Plasma konstant. Sofern die gelagerten Erythrozyten an den einzelnen Untersuchungstagen aber in der Dextran-Pufferlösung sowie in frischem autologem Plasma suspendiert wurden, konnte eine verstärkte Aggregation beobachtet werden. Hovav et al. schlussfolgerten aus diesen Ergebnissen, dass sich die Aggregationsstärke der Erythrozyten mit der Lagerungszeit erhöhen würde, die gleichbleibende Aggregationsstärke im gelagerten Vollblut auf die Abnahme der Fibrinogenkonzentration zurückzuführen sei.

Übertragen auf die Ergebnisse der ABC-Studie wäre bei hier annähernd konstant bleibender Fibrinogenkonzentration eine Zunahme des AI zu erwarten. Möglicherweise sind die zu der Studie von Hovav et al. diskrepanten Ergebnisse auf methodische Ursachen zurückzuführen: In der Studie von Hovav et al. wurden die Erythrozyten zentrifugiert und mehrfach gewaschen und die Aggregabilitätsbestimmungen erfolgten in einer von der

Gruppe eigens entwickelten Strömungskammer mit computergesteuerter Bildanalyse. Hovav et al. führten keine Leukozytendepletion durch. Die Erythrozyten der ABC-Studie wurden lediglich reoxygeniert und nicht weiter aufbereitet.

5.6.4.5. Aggregation und Verformbarkeit

Während des Aggregationsprozesses ist ein enger Kontakt zwischen den Membranen benachbarter Erythrozyten notwendig. Dieser enge Kontakt wird neben der bikonkaven Scheibchenform vermutlich durch die Verformbarkeit der Erythrozyten gewährleistet (24, 31). Eine experimentell induzierte Abnahme der Verformbarkeit zeigte eine Abnahme der Aggregation (24, 38, 151, 293). Diese Beobachtungen beruhen jedoch auf Untersuchungen, bei denen die Erythrozyten weit über ein physiologisches Maß hinaus „verhärtet“ wurden. Mansuri et al. fanden neben der sich vermindernenden Aggregabilität eine Abnahme der Filtrierbarkeit der gelagerten Erythrozyten (237). Daneben zeigen die Werte für den AI und EI in der Studie von Henkelman et al. sehr diskrepante Ergebnisse, d. h. eine Abnahme des EI ging sowohl mit einer Zunahme des AI als auch mit einer Abnahme des AI an den einzelnen Lagerungstagen einher.

Des Weiteren haben ältere Erythrozyten der BOT-Fraktion eine erhöhte zytoplasmatische Viskosität und Membranviskosität, was zu einer verminderten dynamischen zellulären Verformbarkeit führt. Während jüngere TOP- und ältere BOT-Zellen das gleiche Verhältnis von Zelloberfläche-zu-Zellvolumen aufweisen, haben die BOT-Zellen eine geringere Oberfläche und einen signifikant niedrigeren Oberflächenindex sowie Schwellungsindex verglichen mit TOP-Zellen. Hieraus ließe sich schließen, dass die Fähigkeit, die nötige Kontaktfläche zwischen den Zellen zu formen, bei älteren Erythrozyten eingeschränkt ist (293). Sutura et al. beobachteten eine verminderte Verformbarkeit bei alten (nach ihrer Dichte separierten) Erythrozyten (341). Jedoch zeigen gerade die älteren BOT-Zellen eine signifikant stärkere Aggregation als die jüngeren TOP-Zellen.

Basierend auf der Erkenntnis, dass eine ausreichende Kontaktfläche zwischen den einzelnen Erythrozyten zur Ausbildung von Aggregaten notwendig ist, beeinträchtigt nach einem theoretischen Modell von Ju et al. ein unterschiedliches Verformbarkeitsverhalten einzelner Erythrozyten die Aggregationsstärke, d. h. zur suffizienten Ausbildung eines Aggregations-Doublets müssen die beiden beteiligten Erythrozyten über eine gleiche Verformbarkeit verfügen (188).

Nach diesen vorgenannten Erkenntnissen ist es nicht mit Sicherheit zu sagen, ob die abnehmende Verformbarkeit der Erythrozyten in der vorliegenden ABC-Studie eine Erklärung für die abnehmende Aggregation sein könnte.

5.6.4.6. Aggregation und Erythrozytenform

Während des physiologischen Alterungsprozesses der Erythrozyten als auch während der Blutlagerung kommt es zu einer Formveränderung der roten Blutzellen. Zunächst wandelt sich ein Teil der Erythrozyten reversibel in Echinozyten um. Im Weiteren kommt es zur irreversiblen Bildung von Sphärozyten (50, 65, 74, 167, 175, 199, 206, 219, 297, 349). Meiselman et al. beobachteten sowohl bei Echinozyten als auch bei Sphärozyten eine im Vergleich zum normal bikonkav diskoid geformten Erythrozyten eine verminderte Aggregation (247). Ein Grund hierfür wäre der für die Aggregation benötigte enge Zellkontakt. In der ABC-Studie erfolgte keine Untersuchung der Erythrozytenform. Vor dem Hintergrund, dass andere Autoren eine Formveränderung während der Blutlagerung beobachteten, wäre auch in der ABC-Studie hiervon auszugehen. Möglicherweise wäre demnach der sich vermindernde AI über die Lagerungszeit mit der Formveränderung eines Teiles der Erythrozyten zu erklären. Auf der anderen Seite beobachteten Hovav et al. neben besagten Formveränderungen eine Zunahme der Aggregation in frischen Plasma sowie in Dextranlösung mit voranschreitender Lagerungszeit (175).

Unklar hierbei bleibt, da Formveränderungen *in vivo* erst im fortgeschrittenen Erythrozytenalter auftreten und sich die Echinozyten und Sphärozyten demnach in der BOT-Fraktion befinden, warum die Zellen in der BOT-Fraktion eine stärkere Aggregation aufweisen.

5.6.4.7. Aggregation und oxidative Veränderungen

Sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter Lagerungsbedingungen unterliegen die Erythrozyten fortwährend oxidativem Stress. Aktivierte polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) setzen u. a. freie O₂-Radikale und proteolytische Enzyme frei. Freie O₂-Radikale und proteolytische Enzyme führen u. a. zur Lipidperoxidation, zu einem Verlust von Membranproteinen und zu einer Abnahme der Oberflächenladung (siehe Kapitel „Verformbarkeit und oxidative Veränderungen“). Baskurt und Meiselman stellten Suspensionen von Erythrozyten und PMN in einem Verhältnis von 150 : 1 her. Die PMN wurden mittels N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) sowie fMLP plus Tumor-

Nekrose-Faktor α (TNF α) aktiviert. Nach anschließendem Waschen der Erythrozyten und Resuspension in autologem Plasma zeigten die Zellen eine erhöhte Aggregabilität und eine verminderte Verformbarkeit. Bei Abwesenheit von PMN zeigte die alleinige Applikation von fMLP und TNF α keinen Einfluss auf die Aggregabilität, d. h. diese blieb konstant. Hinzufügen der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) plus Catalase (CAT) sowie des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonyl (PMSF) zu der Suspension mit aktivierten PMN konnte den aggregabilitätssteigernden Effekt von fMLP und fMLP plus TNF α nahezu aufheben (29, 246).

Die in der ABC- und der konventionellen Gruppe untersuchten Blutkonserven waren leukozytendepletiert, insofern waren sie einer möglichen Beeinträchtigung von aktivierten PMN nicht ausgesetzt. Dennoch unterliegen auch Erythrozyten in leukozytendepletiertem Vollblut bekanntermaßen während der Lagerung oxidativem Stress. Auch verbleiben nach der Leukozytendepletion bis zu 10 % der Thrombozyten in den Blutkonserven. Thrombozyten beinhalten in ihren Granula ebenfalls die Lagerungseigenschaften der Erythrozyten beeinträchtigende Inhaltstoffe.

In einer weiteren Studie von Baskurt et al. wurde der Einfluss von sowohl extern als auch intern in der roten Blutzelle gebildeten Superoxidanionen auf das Aggregationsverhalten untersucht (38). Die externe Bildung von freien O_2 -Radikalen erfolgte durch die Reaktion von Xanthin-Oxidase (XO) und Hypoxanthin (HX). Mittels Phenazin-Methosulfat erfolgte die interne, d. h. intrazelluläre Generierung von Superoxidanionen. Aggregationsbestimmungen erfolgten in Plasma sowie in 3 %igem Dextran 70 kDa. Die externe Generierung von Superoxiden führte zu einer Abnahme der Aggregation im Plasma, jedoch nicht in der Dextransuspension. Die interne Generierung von Superoxiden hatte keinen Einfluss auf die Aggregation, weder im Plasma noch in der Dextranlösung (38). Warum die von Baskurt et al. beobachtete externe Bildung von Superoxiden nur das Aggregationsverhalten im Plasma und nicht in Dextranlösungen beeinflusste, bleibt bisher unklar. Zudem stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu der durch aktivierte PMN erhöhten Aggregabilität. Möglicherweise gibt es verschiedene Arten von oxidativem Stress mit unterschiedlichen Einflüssen auf Zellbestandteile. In Bezug auf die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Verformbarkeit der Erythrozyten wirken sich extrazellulär gebildete O_2 -Spezies vornehmlich auf die Aggregation aus, während intrazellulär gebildete O_2 -Spezies sich auf die Verformbarkeit auswirken (30, 38).

Die in der ABC-Studie beobachtete Abnahme der Aggregationsstärke wäre demnach möglicherweise auch auf eine Beeinflussung durch oxidativen Stress zurückzuführen.

5.6.4.8. Oberflächenladung der Erythrozyten

Die Aggregation kommt zustande, sofern die aggregierenden Kräfte die disaggregierenden Kräfte übertreffen. Neben der Strömungsgeschwindigkeit wirkt der Aggregation die negative Oberflächenladung der Erythrozyten entgegen. Diese ist v. a. durch die N-Acetylneuraminsäure-Reste der membranständigen Glykoproteine bedingt. Godin et al. beobachteten nach einer achttägigen Lagerung von nicht-leukozytendepletierten Erythrozyten eine Abnahme der negativen Oberflächenladung der Erythrozyten um 60 %. Nach einer zweiwöchigen Lagerung konnten sie keine negative Oberflächenladung mehr nachweisen (145). Experimentell lassen sich mit Neuraminidase die N-Acetylneuraminsäure-Reste von der Zelloberfläche entfernen, sodass es zu einer Verminderung bzw. Aufhebung der negativen Oberflächenladung kommt. Jan und Chien beobachteten infolge einer Inkubation mit Neuraminidase eine verstärkte Aggregation in Dextran-suspensionen (181). In anderen Studien zeigte sich, dass eine künstliche enzymatische Behandlung zur Verminderung der negativen Oberflächenladung in einer verstärkten Aggregation in Dextransuspensionen resultierte (32), jedoch nicht in Plasma (293). Für dieses diskrepante Aggregationsverhalten in Dextran- gegenüber Plasmasuspensionen gibt es bisher keine plausible Erklärung.

Nach den vorgenannten Erkenntnissen müsste demnach die Aggregabilität mit fortschreitender Lagerungszeit zunehmen.

5.6.4.9. Interindividuelle Unterschiede der Aggregation

Im Vergleich zur ABC-Gruppe fand sich initial eine höhere Aggregation in der konventionellen Gruppe, wobei dieser Unterschied bis zum 21. Lagerungstag signifikant war ($p = 0,03$). Eine Differenz des AI zwischen der ABC- und der konventionellen Gruppe blieb über den Lagerungszeitraum erhalten. Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin bestehen, dass die Aggregation der Erythrozyten von normalen, gesunden, erwachsenen Spendern individuell stark variiert (246, 266, 293). Neu et al. beobachteten eine große Variation (Variationskoeffizienten von 20 bis 25 %) der Aggregabilität von gewaschenen und in einer definierten Polymerlösung suspendierten Erythrozyten zwischen einzelnen Spendern (246, 268). Sowemimo-Coker et al. fanden zwischen verschiedenen Individuen

eine annähernd fünffach differierende Aggregationstendenz in autologem Plasma, sowie eine annähernd zweifache Differenz in Dextran. Individuen, die eine hohe Aggregation im Plasma zeigen, haben auch eine hohe Aggregation in Dextranlösungen. Umgekehrt geht eine niedrige Aggregation im Plasma auch mit einer niedrigen Aggregation in der Dextranlösung einher (246, 293). Bei in autologem Plasma suspendierten Erythrozyten ließe sich vermuten, dass die Unterschiede auf eine individuell unterschiedliche Plasmazusammensetzung zurückzuführen seien. Da jedoch die Erythrozyten, welche in autologem Plasma eine erhöhte Aggregation zeigen, auch in Dextranlösungen eine verstärkte Aggregation aufweisen (246), scheinen intrinsische Eigenschaften der roten Blutzellen für diesen Unterschied verantwortlich zu sein.

Ob eine individuell differierende Aggregationsneigung der Spender die Ergebnisse in der vorliegenden ABC-Studie beeinflusst hat, kann retrospektiv nicht mehr geprüft werden, da die Aggregation nicht vor der Blutsammlung bestimmt wurde.

Eine weitere Möglichkeit für den zwischen der konventionellen und der ABC-Gruppe beobachteten Unterschied liegt möglicherweise in dem Blutsammelverfahren mit der kontinuierlichen Vermischung der antikoagulativen Lösung mit dem Vollblut. Es wäre denkbar, dass durch die kontinuierliche Applikation der antikoagulativen und konservierenden CPDA-1-Lösung mit dem Vollblut ein Einfluss auf das Aggregationsverhalten genommen wird.

5.6.4.10. Aggregationsmodelle

Zur Erklärung des Aggregationsprozesses bestehen zwei Hypothesen: das *Bridging*-Modell und das *Depletions*-Modell. Unter Annahme des *Bridging*-Modells wird davon ausgegangen, dass die Adsorption von Makromolekülen an die Oberflächen von benachbarten Zellen zur Aggregation führt, sofern dieser Prozess nicht durch disaggregierende Kräfte wie die elektrostatische Repulsion durch die negative Oberflächenladung oder höhere Scherkräfte verhindert wird (246). Beim *Depletions*-Modell befindet sich eine im Vergleich zum suspendierenden Medium niedrigere Protein- oder Polymerkonzentration in Nachbarschaft der Zelloberfläche und eine höhere Protein-/Polymerkonzentration in der „bulk phase“. Dieser Ausschluss von Makromolekülen in unmittelbarer Nähe zur Zelloberfläche führt zu einem osmotischen Gradienten und infolgedessen zu einer Fortbewegung der Flüssigkeit aus dem Zwischenraum zwischen benachbarten Zellen. Dadurch kommt es zur Depletionsinteraktion. Wie bei dem *Bridging*-Modell erfolgt eine Aggregation, sofern die

Depletionsinteraktionskräfte die disaggregierenden Kräfte überschreiten (264, 265, 293). *Bridging*- und *Depletions*-Modell stellen demnach gegensätzliche Mechanismen dar. Beim *Bridging*-Modell erhöht die Anwesenheit von Makromolekülen an der Zelloberfläche die Aggregation, beim *Depletions*-Modell wird die Aggregation durch die Abwesenheit von Makromolekülen in der Nähe der Zelloberfläche gesteigert (293). Es existieren zahlreiche theoretische und experimentelle Studien über die zwei verschiedenen Modelle (246, 264). Während lange Zeit das *Bridging*-Modell favorisiert wurde, sprechen Ergebnisse jüngerer Studien für die Gültigkeit des *Depletions*-Modells (246, 264, 265, 268) bzw. liefern Hinweise gegen die Gültigkeit des *Bridging*-Modells (16).

Möglicherweise scheint die Struktur der Glykokalix für das Aggregationsverhalten der Erythrozyten von Bedeutung zu sein. Die Glykokalix bezeichnet eine Lage aus Proteinen und Glykoproteinen, welche bedingt durch N-Acetylneuraminsäure-Reste eine negative Ladung haben. Basierend auf der Theorie des *Depletions*-Modells und anhand von Untersuchungen der elektrophoretischen Mobilität, kann die Glykokalix teilweise oder gänzlich von Polymeren penetriert werden (246). Die Penetration von Polymeren beeinflusst die Ausbildung der „Depletionslage“, d. h. der die Erythrozyten umgebenden Zone eines geringeren osmotischen Gradienten. Ältere Erythrozyten verfügen möglicherweise entweder über eine verringerte Glykokalix oder zeigen eine verminderte Polymerpenetration durch die Glykokalix, welches in beiden Fällen mit einer verstärkten Aggregation einhergeht (265, 267, 293). Möglicherweise ist eine unterschiedliche Weite/Dicke der Glykokalix auch für die individuellen Unterschiede der Aggregation zwischen verschiedenen Spendern verantwortlich (246).

Zusammenfassend bestehen zahlreiche Einflüsse, welche auf die Aggregation der Erythrozyten Einfluss nehmen. Lebensalter der Erythrozyten, oxidativer Stress, Veränderungen der Zelloberfläche und der Glykokalix sind in vielen Studien überwiegend mit einer erhöhten Aggregation assoziiert. Veränderungen der Verformbarkeit und der Form der Erythrozyten zeigen in verschiedenen Studien häufig eine verminderte Aggregation. Einige Ergebnisse in der Literatur sind widersprüchlich, was wiederum unterstreicht, dass viele Fragen noch unbeantwortet sind. Die in der ABC-Studie beobachtete Verminderung des AI beruht vermutlich auf mehreren Faktoren wie der Abnahme der Verformbarkeit und einer Formveränderung sowie Einflüssen von oxidativem Stress auf Strukturen der Zelloberfläche und der Zellbestandteile. Der

Unterschied des AI zwischen der konventionellen und der ABC-Gruppe könnte auf dem Blutsammelungsverfahren mit kontinuierlicher Zuführung der Antikoagulanzlösung und/oder auf individuellen Unterschieden der Aggregationsstärke zwischen den einzelnen Spendern beruhen.

5.6.5. Aggregation und Strömungsverhalten

Blut ist eine nicht-newtonische Flüssigkeit. Die Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten ist hauptverantwortlich für die Strukturviskosität des Blutes, d. h. für die abnehmende Viskosität bei zunehmender Schergeschwindigkeit und umgekehrt (33). Unter *in vitro* Bedingungen bestimmt die Aggregation der Erythrozyten maßgeblich die Blutviskosität bei geringer bzw. niedriger Scherung (34). Verstärkt sich die Aggregation bei geringer Scherung und bei einem konstanten Hämatokrit, erhöht sich die scheinbare Viskosität des Blutes (32, 33, 87). Bei kompletter Aufhebung der Aggregationsfähigkeit zeigt sich nur ein sehr minimaler Anstieg der Viskosität bei niedrigen Scherungsgeschwindigkeiten, vermutlich bedingt durch die Verformbarkeit der Erythrozyten (15, 60). Übertragen auf *in vivo*-Verhältnisse, beeinflusst die Aggregation die Blutviskosität insbesondere im venösen System, da dort physiologisch die Strömungsgeschwindigkeiten niedriger sind als im arteriellen System (6, 32, 33, 194).

Die Aggregationsfähigkeit führt dazu, dass sich die Erythrozyten bei geringeren Strömungsgeschwindigkeiten im Zentrum der Blutströmung ansammeln. Dieses als axiale Migration bezeichnete Phänomen bedingt die Ausbildung einer zellarmen bzw. zellfreien Plasmalage entlang der Gefäßwand (32, 59, 86, 195, 274). Durch die Plasmalage reduzieren sich der Reibungswiderstand und damit die auf die Gefäßwand wirkende Scherung. Die Weite der Plasmalage ist zum einen von der Stärke der Aggregation abhängig, zum anderen von der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes (274).

Durch die Ausbildung der Plasmalage kommt es zum „plasma-skimming“. An Gefäßaufzweigungen und Bifurkationen wird durch die Phasenseparation – d. h. axialer Erythrozytenstrom, zellarmer bzw. zellfreier Plasmarandsaum – der Hämatokrit nicht gleichmäßig auf die abzweigenden Gefäße verteilt, d. h. einige Gefäße erhalten mehr Plasma, andere wiederum mehr Erythrozyten (32, 195, 283).

Infolge einer verstärkten Aggregation erhöht sich die axiale Migration der Erythrozyten in das Zentrum der Blutströmung und es vergrößert sich die zellarme bzw. zellfreie

Plasmalage. Konsekutiv reduzieren sich die Scherung an der Gefäßwand und damit der Strömungswiderstand (34, 123, 274). Zudem kommt es durch die Verbreiterung der Plasmalage über das „plasma-skimming“ zu einer stärkeren Ungleichverteilung von Erythrozyten und Plasma auf die Gefäße der Mikrozirkulation (11, 44, 67).

Bei experimentellen Untersuchungen wurde sich insbesondere mit den Auswirkungen einer verstärkten Aggregation beschäftigt. Zur Induktion und Verstärkung der Aggregation werden u. a. hochmolekulargewichtige Polymere wie Dextrane verwendet. Dextrane liegen in unterschiedlichen molekularen Größen vor, z. B. 70 kDa, 100 kDa, 500 kDa. Abhängig von deren Molekülgröße und ihrer Konzentration lässt sich die Stärke der Aggregation verändern oder inhibieren (293). Die Aggregationsstärke steigt dabei jedoch nicht gleichermaßen mit der Polymergröße, sondern scheint vielmehr ein Optimum bei Polymeren im Bereich von 200 bis 500 kDa zu haben (268). Aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes erhöhen Dextrane jedoch auch die Viskosität des Plasmas (33, 35). Durch eine erhöhte Aggregation kommt es infolge der verstärkten Axialmigration und Vergrößerung der Plasmalage zu einer Verminderung des Strömungswiderstandes. Andererseits wird durch die hochmolekularen Polymere die Plasmaviskosität erhöht, was den Strömungswiderstand entlang der Gefäßwand vergrößert (35).

Alternativ lassen sich zur Induktion der Aggregation spezielle Poloxamere oder Polyethylenglykol (PEG) einsetzen. Poloxamere sind nichtionische Polymere (Pluronic), welche über selbstassoziierende Eigenschaften verfügen. Sie binden kovalent an die Oberfläche von Erythrozyten und induzieren und verstärken ebenfalls konzentrationsabhängig die Aggregation der Erythrozyten, jedoch ohne die Plasmaviskosität zu beeinflussen (17, 33, 246).

Bei *in vitro*-Untersuchungen in Glasröhrchen oder in von den Untersuchern meist selbst entwickelten Strömungskammern zeigten sich teilweise, abhängig von der Versuchsanordnung, gegensätzliche Ergebnisse. Cokelet et al. und Alonso et al. beobachteten in Versuchen mit vertikal angeordneten Röhrchen bei erhöhter Aggregation und verminderten Strömungsgeschwindigkeiten eine Abnahme des Strömungswiderstandes und der Viskosität (6, 86). Bei einer horizontalen Anordnung der Röhrchen registrierten Alonso et al. hingegen bei verstärkter Aggregation eine Zunahme des Strömungswiderstandes und eine Erhöhung der Viskosität (7). Dieser Unterschied liegt höchstwahrscheinlich darin, dass es in geraden horizontalen Röhrchen bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten zu einer

verstärkten Sedimentation der Erythrozyten kommt und die Ausbildung der zellarmen Plasmalage im unteren Bereich des Röhrchens ausbleibt (7, 60). In geraden vertikalen Röhrchen kommt es bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten zur axialen Migration, der Ausbildung einer zellarmen Plasmalage und daher zu einem verminderten Strömungswiderstand an der Gefäßwand (6, 33, 60).

In vitro-Untersuchungen unterliegen zahlreichen Limitationen. Die autoregulatorischen Mechanismen des vaskulären Gefäßbettes können *in vitro* nicht nachgebildet werden. In der Mikrozirkulation wird auf veränderte Strömungsbedingungen und Strömungswiderstände rasch mit einer Vasokonstriktion oder Vasorelaxation reagiert. Möglicherweise beeinflussen die Oberfläche der Endothelzellen und die Glykokalix zudem die Strömungseigenschaften des Blutes. Blutgefäße haben selten einen gleichbleibenden gleichmäßigen Durchmesser. Kalibersprünge und Abknickungen kommen in der Zirkulation zahlreich vor. Zudem ist ein wesentliches Kriterium für die Ausbildung einer suffizienten Axialmigration und Phasenseparation die zeitliche Distanz, welche die Erythrozyten in einem Gefäß zurückgelegt haben müssen, ohne dass ihr Strömungsprofil durch Gefäßabzweigungen gestört wird (58-60). Aggregate sind nicht sofort am Gefäßbeginn vorliegend. Kim et al. beobachteten nach Induktion der Aggregation mittels Dextran 500 kDa in einem Präparat des M. spinotrapezius von Ratten, dass sich bis zu 90 % der Aggregatbildung in den venösen Kapillaren nach Eintritt in ein Gefäß innerhalb von 0,15 bis 0,3 Sekunden in einer Strecke von 15 bis 30 μm ereignen (194). Dabei wird mit Dextran 500 kDa die Aggregation weit über das physiologische Maß hinaus verstärkt. In der Mikrozirkulation kommt es durch den ständigen Abfluss bzw. Zufluss von Blut an den zahlreichen Gefäßabzweigungen und Bifurkationen zu Verwirbelungen der Blutströmung, was eine suffiziente Axialmigration und Phasenseparation beeinträchtigt (33, 59, 195). Daher ist möglicherweise die Verweildauer des strömenden Blutes in einem entsprechenden unverzweigten Gefäßabschnitt zu kurz, um eine suffiziente Phasenseparation auszubilden (58, 59). Zudem muss wahrscheinlich die Strömungsgeschwindigkeit sehr gering sein, möglicherweise unterhalb der physiologischen Gegebenheiten, damit eine suffiziente Aggregation und Ausbildung einer Plasmalage auftreten können (60).

Die *in vitro*-Beobachtungen sind demnach nicht ohne Weiteres auf die realen *in vivo*-Verhältnisse übertragbar. Bereits 1933 beobachteten Whittaker und Winton, dass die scheinbare Viskosität des Blutes *in vivo* niedriger ist als die *in vitro* gemessene (379). Ebenso ist in kleinen Gefäßen mit einem Durchmesser unter 40 μm der Strömungswiderstand

höher und stärker abhängig vom Hämatokrit als dieses von Strömungsmessungen in Glasröhrchen anzunehmen wäre (285).

In vivo-Untersuchungen erfolgen zum einen mittels intravitaler Mikroskopie an Gewebepreparaten, zum anderen durch Perfusionsmessungen an Vollorganpreparaten (33, 35).

Die Ergebnisse von intravital mikroskopischen Untersuchungen unterscheiden sich teilweise deutlich zwischen den Untersuchungsgruppen. Überwiegend fand sich unter Anwendung der intravitalen Mikroskopie ein erhöhter mikrovaskulärer Strömungswiderstand bei einer erhöhten Aggregation (33, 113, 260, 329).

Um einige Beispiele der zahlreichen Studien zu nennen, beobachteten z. B. Namgung et al. bei künstlich erhöhter Aggregation (Dextran 500 kDa) und bei gleichzeitig verminderten Strömungsgeschwindigkeiten eine Zunahme der Wandscherung im M. cremaster von Ratten. Dieser Effekt beruht vermutlich darauf, dass es infolge der erhöhten Aggregation bei verminderten Strömungsgeschwindigkeiten zu einer größeren Variation in der Weite der zellfreien/zellarmen Plasmalage kommt, wie dieses von Namgung et al. registriert wurde (260). Ebenso fanden Durussel et al. und Soutani et al. eine Zunahme des Strömungswiderstandes nach künstlicher Erhöhung der Aggregation im Mesenterium von Ratten (113, 329). Johnson et al. beobachteten infolge einer Perfusion des M. spinotrapezius von Ratten mit einer nichtaggregierenden Zellsuspension, dass der venöse Strömungswiderstand um ungefähr 50 % abnahm (186).

Bei Perfusionsuntersuchungen von Vollorganpreparaten fanden sich sehr divergierende Ergebnisse. Auf eine erhöhte Aggregation wurden sowohl eine Abnahme, eine Zunahme oder gar kein Effekt auf den Strömungswiderstand beobachtet. Dabei scheinen aber Veränderungen des Strömungswiderstandes abhängig von der Stärke der Aggregation zu sein (33). Charansonney et al. beobachteten an Vollorganpreparaten von Rattenherzen bei mit 1 % Dextran 70 kDa induzierter verstärkter Aggregation einen reduzierten Strömungswiderstand und bei 2 % Dextran 70 kDa einen erhöhten Strömungswiderstand, verglichen mit Suspensionen aus nicht-aggregierenden Erythrozyten (78). Unter Verwendung der neuartigen Poloxamere untersuchten Yalcin et al. die Auswirkungen der Aggregation auf den Strömungswiderstand an Präparaten von hinteren Gliedmaßen von Meerschweinchen. Die autoregulatorischen vaskulären Kontrollmechanismen waren bei den Präparaten nicht unterbunden. Yalcin et al. beobachteten bei einer moderaten Aggregation eine Erhöhung des Strömungswiderstandes, bei steigender Aggregation zeigte sich eine Verminderung des

Strömungswiderstandes auf normale Verhältnisse. Mit höchstem Aggregationsgrad fand sich wiederum ein Anstieg des Strömungswiderstandes (17, 393).

In einer weiteren Studie führten Yalcin et al. Perfusionsuntersuchungen an einem isolierten Herzpräparat eines Meerschweinchens durch. Hierbei konnten sie eine Erhöhung des Strömungswiderstandes beobachten, sofern sie die Präparate mit stark aggregierenden Erythrozyten perfundierten und gleichzeitig verminderte arterielle Blutdrücke vorlagen, d. h. Blutdrücke unterhalb von 60 mmHg bei den untersuchten Meerschweinchen-Herzpräparaten (33, 390).

So zeigten sich abhängig von den angewendeten Untersuchungsmethoden – intravitale Mikroskopie vs. Perfusionsuntersuchungen an Organen – unterschiedliche Tendenzen einer erhöhten oder verminderten Aggregation. Mit ursächlich für den Unterschied mag die räumliche Ausrichtung der Gefäße sowie die Auswirkungen der Schwerkraft sein. Bei der intravitalen Mikroskopie wird das Gewebe unter einem Mikroskop platziert und die Gefäße befinden sich in einer horizontalen Anordnung. In Organpräparaten behalten die Gefäße ihre natürliche Anordnung in allen Ebenen des Raumes. Unter Berücksichtigung der Schwerkraft kommt der Orientierung der Gefäße – horizontal vs. vertikal – eine wichtige Bedeutung zu (35, 60). Axiale Migration und Phasenseparation resultieren in einem verminderten Strömungswiderstand und einer verminderten scheinbaren Viskosität in vertikalen Glasröhrchen (6), Sedimentation von Erythrozytenaggregaten bewirkt in horizontalen Glasröhrchen eine Zunahme der scheinbaren Viskosität und des Strömungswiderstandes (7, 35).

Weitere Einflüsse der Aggregation auf das Strömungsverhalten bestehen darin, dass Erythrozytenaggregate, sofern es zu deren Ausbildung im arteriellen Gefäßsystem z. B. bei erhöhter Aggregationsneigung und/oder verminderter Strömungsgeschwindigkeit kommt, beim Eintritt in kleinere Gefäße der Mikrozirkulation aufgelöst werden müssen (26, 33). An jeder Gefäßaufzweigung und Bifurkation in der Mikrozirkulation müssen größere Aggregate aufgelöst werden, um die Gefäße passieren zu können. Bei einer stärkeren Aggregationsneigung wird eine höhere Scherung benötigt, um die Aggregate zu disaggregieren (38). Mit der Disaggregation ist ein Energieaufwand verbunden, welcher zu einer Erhöhung des Strömungswiderstandes in der Mikrozirkulation führt (30, 32, 33, 37). Möglicherweise können größere Aggregate Gefäße auch gänzlich verlegen und dadurch eine Minderperfusion entsprechender Gewebegebiete verursachen (223). Auch können

größere Aggregate in der Strömung ins Trudeln geraten und so das Strömungsprofil stören. Die Einflüsse auf den hämodynamischen Strömungswiderstand stehen sich demnach gegenüber: Die axiale Migration der Erythrozyten mit konsekutiver Ausbildung einer Plasmalage und Verminderung des mikrozirkulatorischen Hämatokrits führt zu einer Verminderung des Strömungswiderstandes, der Disaggregationsprozess führt über einen vermehrten Energieaufwand zu einer Erhöhung des hämodynamischen Widerstandes (32, 35).

In einem weiteren Zusammenhang mit einer verstärkten Aggregation wird die Abschwächung des parabolischen Profils der Poiseuille'schen Strömung gesehen (58). Durch die Axialmigration der Erythrozyten ist die Viskosität im Zentrum des Flusses erhöht, was dort die Strömungsgeschwindigkeit etwas begrenzt (60). Dieses verstärkt sich insbesondere bei niedrigen Perfusionsdrücken. Hiermit gehen ebenfalls Energieverluste einher, welche zu einer Erhöhung des Strömungswiderstandes beitragen könnten.

Vermutlich hat das Ausmaß der Aggregation auch einen direkten Einfluss auf die mikrovaskuläre Autoregulation. Durch eine verstärkte Aggregation vermindert sich über die Ausbildung der zellarmen Plasmalage der Reibungswiderstand an der Gefäßwand. Dadurch vermindert sich der physiologische Reiz zur Synthese und Freisetzung von NO durch die Endothelzellen (32, 35, 40, 86, 351, 392). Physiologisch führt eine erhöhte Wandscherung zur Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und damit zur Synthese und Freisetzung von NO (35, 351, 397). Durch eine erhöhte Aggregation kommt es vermutlich zu einer Verminderung bzw. Herabregulierung der Synthesemechanismen für NO (verminderte Serin-Phosphorylierung der endothelialen NO Synthase eNOS) (40, 392). Baskurt et al. beobachteten an einem *in vivo*-Modell des *M. gracilis* von Ratten, dass es bei chronischer, d. h. über mehrere Tage verstärkter Aggregation zu einer Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes kam. In der Folge zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl nach Applikation von Acetylcholin als auch nach Erhöhung der Blutströmung/des Blutdruckes eine verminderte Dilatation der Arteriolen. Einhergehend fanden Baskurt et al. eine verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase, vermutlich infolge einer Down-Regulation dieses Enzyms. Diese Veränderung konnte bereits nach einer über vier Tage erhöhten Aggregation beobachtet werden (32, 40).

Verschiedene Untersuchungsgruppen betrachteten die Auswirkungen einer erhöhten Aggregation auf die FCD (functional capillary density, siehe Kapitel „Verformbarkeit und Strömungsverhalten“). Dabei beobachteten u. a. Mchedlishvili et al. (245), Vicaut et al. (363) und Kim et al. (195) eine Abnahme der FCD in Organpräparaten verschiedener Tiere nach künstlicher Erhöhung der Aggregation – induziert durch Perfusion mit Dextranen verschiedener Molekülgrößen. Die Verminderung der FCD war dabei noch ausgeprägter, sofern anämische und hypotone Konditionen vorlagen. Kim et al. erhöhten bei Untersuchungen an Präparaten des M. spinotrapezius von Ratten die Aggregationsstärke von Rattenerythrozyten auf Werte von humanen Erythrozyten. Nach Perfusion von Dextran 500 kDa verminderte sich die FCD auf 96 % des Ausgangswertes. Anschließend erzeugte hypotone Blutdruckwerte von 50 mmHg bzw. 25 mmHg führten zu einer Abnahme der FCD auf 79 % bzw. 37 % des Ausgangswertes. D. h. die Kombination von einer erhöhten Aggregation und einem verminderten arteriellen Druck führt zu einer ausgeprägten Abnahme der FCD (195). Veränderungen der FCD infolge einer erhöhten Aggregation beruhen möglicherweise auf einem verstärkten „plasma-skimming“. Ebenfalls könnte es durch eine verstärkte Aggregation zu einem Verlegen von Gefäßen durch größere Aggregate kommen. Mchedlishvili et al. fanden in nicht durchströmten Gefäßen dicht gepackte Erythrozytenaggregate (33, 244, 245). Diese Beobachtung konnten Kim et al. in ihren Untersuchungen jedoch nicht bestätigen (195).

Einschränkend sei erwähnt, dass das hochmolekulare Dextran zu einer Erhöhung der Plasmaviskosität führt und demnach einen gesonderten – eigenen – Effekt auf die FCD haben könnte. Zudem bilden die Untersuchungen an Rattenpräparaten die humanen Verhältnisse nicht exakt ab.

Die verstärkte Axialmigration der Erythrozyten in das Zentrum des Gefäßes fördert auch die Margination von Thrombozyten und Leukozyten in die gefäßwandnahen Bereiche der Blutströmung und erleichtert so möglicherweise deren Adhäsion an das Endothel (33, 277, 278).

Zudem kann eine ausgeprägte, größere zellarme bzw. zellfreie Plasmalage eine Barriere für die O₂-Diffusion in die Gewebe darstellen (260, 343).

Zu bedenken ist, dass die zur Induktion und Verstärkung der Aggregation verwendeten Dextrane und Poloxamere die Aggregation weit über ein physiologisches Maß hinaus erhöhen. Dieses führt zu einer äußerst ausgeprägten Reduktion des mikrozirkulatorischen

Hämatokrits. Sofern Fibrinogen zur Induktion und Verstärkung der Aggregation verwendet wird, verändern hohe Fibrinogenkonzentrationen den Hämatokrit in der Mikrozirkulation nur unwesentlich (223). Zudem muss bedacht werden, dass sich die an Tieren, hauptsächlich Ratten, Hamstern und Meerschweinchen, erzielten Beobachtungen nicht ohne Weiteres auf den humanen Organismus übertragen lassen. Z. B. weisen die Erythrozyten von Ratten im Vergleich zu den Erythrozyten von Menschen eine viel geringere physiologische Aggregation auf. Vermuten lässt sich, dass auch Besonderheiten in der Mikrozirkulation dieser Tiere bestehen könnten, was sie von den humanen Verhältnissen unterscheidet.

Die hämodynamischen Auswirkungen einer veränderten Erythrozytenaggregation in der Mikrozirkulation sind mit dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht eindeutig und umfassend zu beschreiben. So sind unsere bisherigen Erkenntnisse vielmehr nur Näherungen an die tatsächlichen Verhältnisse. Die umfangreiche mikrozirkulatorische Autoregulation kann lokale hämorheologische Veränderungen bis zu einem gewissen Grade leicht ausgleichen. Eine ausgeglichene, d. h. eine nicht zu hohe und nicht zu geringe Aggregation scheint für die Strömungsregulation sehr wichtig zu sein.

Fraglich bleibt, inwiefern sich die geringe Verminderung der Aggregation des in der vorliegenden ABC-Studie untersuchten Blutes auf die hämodynamischen Verhältnisse der Zirkulation auswirkt, ob die beobachtete Reduktion der Aggregation positive oder negative Auswirkungen hat und inwiefern diese Veränderungen durch die autoregulatorischen Kompensationsmechanismen des Empfängerorganismus ausgeglichen bzw. aufgehoben werden. Verschiedene Krankheiten und pathologische Bedingungen sind mit einer erhöhten Aggregation assoziiert. Hier ist möglicherweise eine verminderte Aggregation transfundierter Erythrozyten von Vorteil.

5.6.5.1. Krankheiten mit erhöhter Aggregation

Bei verschiedenen Erkrankungen finden sich Veränderungen der rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten. Eine erhöhte Aggregation zeigt sich z. B. bei der Myokardischämie, Angina pectoris (269, 291), beim chronischen Koronarsyndrom, bei der cerebralen Ischämie und bei peripheren vaskulären Krankheiten, ebenso bei der arteriellen Hypertonie, dem Diabetes mellitus, dem metabolischen Syndrom, Nierenversagen und der Sepsis, dem Morbus Waldenström und beim multiplen Myelom. Auch bei chronischen Entzündungen wie der rheumatoiden Arthritis und dem systemischen Lupus

erythematodes und bei hämatologischen Erkrankungen wie der Thalassämie und Sichelzellanämie lässt sich eine erhöhte Aggregation beobachten (32, 293, 395).

Im Zusammenhang mit einer Infektion (z. B. eine Sepsis) kommt es zu einer Erhöhung der Akute-Phase-Proteine. Diese, insbesondere das Akute-Phase-Protein Fibrinogen, stehen in Zusammenhang mit einer Erhöhung der Aggregation (25, 30, 222). Die Aggregation der Erythrozyten ist auch die Ursache für eine beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit bei entzündlichen Prozessen, erstmals beschrieben durch Robin Fåhræus (32). Rainer et al. fanden bei Patienten mit chronisch stabiler Angina pectoris eine signifikante Korrelation zwischen dem Aggregationsindex (Myrenne-Aggrometer®) und dem Fibrinogengehalt ($p < 0,05$) und einer erhöhten Blutviskosität ($p < 0,005$) im Vergleich zu gesunden Probanden (291). Ebenso findet sich beim Diabetes mellitus, beim arteriellen Hypertonus und nach einem postoperativem Trauma eine erhöhte Fibrinogen-Konzentration (292, 328). Durch die arterielle Hypertension wird möglicherweise ein mikrovaskulärer Schaden hervorgerufen, welcher zu einer Entzündung und konsekutiv zur Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen führt (32, 281).

Jedoch kann im Falle einer Infektion die Erhöhung der Aggregation nicht alleine auf die Erhöhung der Akute-Phase-Proteine zurückgeführt werden. Erythrozyten von septischen Patienten zeigen auch in Dextransuspensionen eine erhöhte Aggregabilität (293). Während schwerer Infektionen sind neben plasmatischen Veränderungen höchstwahrscheinlich ebenso zelluläre, intrinsische Eigenschaften der Erythrozyten für deren erhöhte Aggregationsneigung verantwortlich (8, 32, 293). Die genauen Veränderungen der zellulären Komponenten mit Einfluss auf die Aggregation sind noch nicht bekannt, könnten aber durch Neutrophile und freie O_2 -Radikale beeinflusst werden (32, 38). Ebenfalls nicht geklärt ist, ob eine erhöhte Aggregation der Erythrozyten eine Folge der Krankheiten ist oder ob eine erhöhte Aggregation an der Pathophysiologie der jeweiligen Krankheit mitbeteiligt ist (246).

5.7. Krankheitsstudien

In den vergangenen Jahren gaben verschiedene Studien Anlass zu der Vermutung, dass sich Transfusionen von länger gelagertem Vollblut oder Erythrozytenkonzentraten negativ auf die Morbidität und Mortalität von schwer kranken oder herzchirurgisch versorgten erwachsenen Empfängern (19, 202, 214, 372) oder auch von herzchirurgisch versorgten Neugeborenen auswirken könnten (295). In Zusammenhang mit der Verabreichung länger

gelagerter Blutprodukte an schwer erkrankte Patienten, d. h. Patienten auf Intensivstationen, Trauma-Patienten, Patienten mit Sepsis oder SIRS, akuter Herzkrankheit und Patienten im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen, zeigten sich erhöhte Risiken für das Auftreten von nosokomialen Infektionen, Beeinträchtigung des Immunsystems, Länge des Aufenthaltes auf der Intensivstation, Länge der Beatmungszeit, Länge des Aufenthaltes im Krankenhaus, akutes Nierenversagen, Multiorganversagen, tiefe Beinvenenthrombose und Rezidive von Karzinomen (18, 19, 109, 141, 214, 287, 327, 333, 360, 365, 370, 377). Diese negativen Auswirkungen konnten sowohl in Zusammenhang mit nicht-leukozytendepletierten als auch mit leukozytendepletierten Blutprodukten beobachtet werden (365). Neben dem Alter der gelagerten Blutprodukte ist auch die Menge des verabreichten alten Blutes ein unabhängiger Risikofaktor für negative Auswirkungen (193, 360, 376).

In der Literatur finden sich zahlreiche, meist retrospektive Beobachtungsstudien bezüglich klinischer Auswirkungen von Bluttransfusionen. Die Ergebnisse sind zum Teil sehr widersprüchlich. Zusammenfassungen verschiedener retrospektiver Studien finden sich u. a. bei Aubron et al. (19), Lelubre et al. (215), Vandromme et al. (360), Wang et al. (372) sowie bei Zimrin und Hess (400).

Aubron et al. untersuchten anhand einer PubMed-Literaturrecherche die Auswirkungen von Transfusionen länger gelagerten Blutes bei schwer kranken Patienten, d. h. Trauma-Patienten, Patienten auf Intensivstationen, Patienten mit Herzoperationen und mit akuter Herzkrankheit. Von 32 eingeschlossenen Studien fanden sich in 18 Studien Hinweise auf einen schädlichen Einfluss länger gelagerten Blutes auf klinisch relevante Endergebnisse. In 14 Studien zeigte sich hingegen kein negativer Effekt einer verlängerten Blutlagerungsdauer (19).

Kritikpunkte an nahezu sämtlichen vorhandenen Studien sind, in Bezug auf die Recherche von Aubron et al. insbesondere bei den Studien, die keinen negativen Einfluss länger gelagerten Blutes zeigten, die teilweise sehr geringen Fallzahlen und eine sehr uneinheitliche Definition, ab wie vielen Lagerungstagen Blut als „alt“ anzusehen ist. Weitere wesentliche Kritikpunkte an der überwiegenden Zahl der existierenden Studien sind die retrospektive Betrachtungsweise, der unzureichende Umgang mit Confoundern – u. a. mit zugrundeliegenden Erkrankungen und Komorbiditäten – eine ungenaue Formulierung von Endpunkten, zudem eine Heterogenität im Alter des verabreichten Blutes. In einigen Studien erhielten Patienten sowohl frisches als auch altes Blut. Je nachdem, wieviel sie

jeweils von dem frischeren oder älteren Blut erhielten, wurden sie in der einen oder der anderen Gruppe eingeschlossen. Teilweise wurde in den Studien nicht klar zwischen leukozytendepletiertem und nicht-leukozytendepletiertem Blut unterschieden (19, 333, 360).

Wang et al. fanden bei einer Literaturrecherche mit Einschluss von 21 verschiedenen Studien eine signifikante Zunahme der Mortalität nach Verabreichung älteren Blutes im Vergleich zu frischerem Blut (OR 1,16; 95 %-KI 1,07-1,24) (372).

Koch et al. führten 2008 eine relativ große retrospektive single-center Studie bei herzchirurgischen Patienten durch. Eingeschlossen wurden 6002 Patienten, die sich einer Koronararterien-Bypass-OP oder/und einer Herzklappen-OP unterzogen hatten. In der einen Gruppe erhielten Patienten entweder ≤ 14 Tage gelagerte Erythrozytenkonzentrate, in der anderen Gruppe ≥ 14 Tage gelagerte Erythrozytenkonzentrate. Patienten in der Gruppe mit den länger gelagerten Transfusionseinheiten zeigten signifikant eine höhere Krankenhausmortalität, eine längere Beatmungszeit als 72 Stunden, ein signifikant höheres Auftreten von Nierenversagen und Sepsis und es traten insgesamt mehr Komplikationen in dieser Gruppe auf (202). Kritikpunkte an der Studie von Koch et al. waren neben dem retrospektiven Ansatz das Fehlen einer Adjustierung wichtiger Confounder. Zwischen den Patienten bestanden Unterschiede bei dem totalen verabreichten Blutvolumen und bei Komorbiditäten. Patienten erhielten sowohl leukozytendepletierte als auch nicht-leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate. In der Gruppe mit dem jüngeren Blut wurde zudem weniger leukozytendepletiertes Blut verabreicht und es bestand eine Ungleichverteilung der AB0-Blutgruppen zwischen den Untersuchungsgruppen.

Aufgrund der divergenten Ergebnisse und der Heterogenität vieler Studien wurden und werden prospektive Kontrollstudien gefordert. Diesbezüglich erfolgte die Durchführung von vier größeren prospektiven, multi-center randomisierten Kontrollstudien, von denen die TRANSFUSE-Studie derzeit noch nicht beendet ist:

1.: In der TRANSFUSE-Studie (sTandaRd issue trANsfusion versuS Fresher red blood cell Use in intenSive carE) wurden 5000 Patienten in Australien und Neuseeland randomisiert. Die Frage ist, ob die Verabreichung der jüngsten zur Verfügung stehenden Erythrozyten die 90-Tage-Mortalität der Patienten senkt. In der Kontrollgruppe erfolgen Transfusionen nach der Standardpraxis, d. h. es wird das älteste zur Verfügung stehende Blut der jeweiligen Blutgruppe transfundiert (1, 19).

2.: In der RECESS-Studie (effects of REd-CELL Storage duration on patients undergoing cardiac Surgery) erhielten 1098 herzchirurgische Patienten an verschiedenen Zentren in den Vereinigten Staaten entweder für \leq zehn Tage oder \geq 21 Tage in AS-1, AS-3 oder AS-5 gelagerte leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate transfundiert. Primärer Endpunkt war eine Veränderung des „Multiple Organ Dysfunction Score“ (MODS). In der RECESS-Studie zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen der Dauer der Blutlagerung und Veränderungen des MODS (336, 337).

3.: In der ABLE-Studie (Age of BLOOD Evaluation bzw. Age of Transfused Blood in Critically Ill Adults) waren 2430 schwer kranke erwachsene Patienten auf Intensivstationen in Kanada, Frankreich und im Vereinigten Königreich eingeschlossen. Die Patienten erhielten entweder \leq acht Tage in SAG-M gelagerte leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate oder unterlagen der gängigen Standardtransfusionspraxis (d. h. die ältesten zur Verfügung stehenden Erythrozytenkonzentrate, 22 (SD 8,4) Tage). Der primäre Endpunkt war die 90-Tage-Mortalität. Sekundäre Endpunkte waren schwerwiegende Erkrankungen, eine Erhöhung des „Multiple Organ Dysfunction Score“ (MODS), Beatmungsdauer, Krankenhausaufenthalt u. a.. In dieser Studie fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die 90-Tage-Mortalität als auch in Bezug auf die sekundären Endpunkte (207, 208).

4.: Bereits im Jahr 2012 wurden die Ergebnisse der doppelblind randomisierten Kontrollstudie ARIPI (Age of Red Blood Cells In Premature Infants) veröffentlicht. In der ARIPI-Studie wurden 377 Neugeborene auf Intensivstationen in Kanada mit niedrigen Geburtsgewichten eingeschlossen. Die Patienten erhielten leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate, die entweder \leq sieben Tage gelagert wurden oder nach der gängigen standardisierten Transfusionspraxis. Das mittlere Alter der transfundierten Erythrozytenkonzentrate betrug 5,1 (SD 2,0) Tage in der Gruppe der „frischen“ Erythrozyten und 14,6 (SD 8,3) Tage bei den „alten“ Erythrozyten. Dabei bestand die Frage, ob frisches Blut das Auftreten von nosokomialen Infektionen und Organdysfunktionen bei Neugeborenen reduziert. Primäre Endpunkte waren nekrotisierende Enterokolitis, Retinopathie von Frühgeborenen, bronchopulmonale Dysplasie, intraventrikuläre Hämorrhagie und Mortalität. Sekundäre Endpunkte waren nosokomiale Infektionen. In der ARIPI-Studie zeigte sich kein Vorteil frischerer Erythrozyten gegenüber älteren Erythrozyten (127, 128).

5.8. Suffiziente O₂-Versorgung durch Transfusionen?

Eine weitere Frage besteht dahingehend, ob durch Transfusion länger gelagerten Blutes eine suffiziente O₂-Versorgung der Gewebe gewährleistet werden kann.

Marik et al. beobachteten bei septischen Patienten, welche länger als 15 Tage gelagerte nicht-leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate erhielten, einen Abfall des Mukosa-pH-Wertes des Magens als Zeichen eines verminderten splanchnischen O₂-Angebotes. Es wurden insgesamt drei Einheiten von in CPDA-1 gelagerten Erythrozytenkonzentraten gleicher Lagerungsdauer verabreicht. Der Mukosa-pH-Wert des Magens wurde tonometrisch vor der Transfusion und drei bis sechs Stunden nach der Transfusion bestimmt. Es zeigte sich eine inverse Assoziation zwischen der Veränderung des Magenmukosa-pH-Wertes und dem Alter des transfundierten Blutes ($P < 0,001$). Die Studiengröße umfasste jedoch lediglich 23 Patienten (238).

Walsh et al. konnten die Ergebnisse von Marik et al. nicht bestätigen. Bei 22 schwer kranken Patienten auf einer Intensivstation fanden sie keine Veränderung des Mukosa-pH-Wertes des Magens nach Verabreichung von länger gelagerten Erythrozytenkonzentraten (≥ 20 Tage) im Vergleich zu weniger lange gelagerten Erythrozytenkonzentraten (\leq fünf Tage). Den einzelnen Patienten wurden jeweils insgesamt zwei leukozytendepletierte und in SAG-M gelagerte Erythrozytenkonzentrate verabreicht (371).

Ebenfalls beobachten Sakr et al. keine signifikante Veränderung der sublingualen mikrovaskulären Perfusion nach Bluttransfusionen. 35 septischen Patienten auf einer Intensivstation wurden jeweils ein bis zwei Einheiten leukozytendepletierter in SAG-M gelagerter Erythrozytenkonzentrate verabreicht. Die mittlere Lagerungszeit betrug 24 Tage. Die sublinguale mikrovaskuläre Perfusion wurde mittels Orthogonal Polarization Spectral (OPS) beurteilt (310).

Möglicherweise liegen die Unterschiede der Ergebnisse von Marik et al. zu denen von Walsh et al. und zu denen von Sakr et al. darin begründet, dass Marik et al. mit drei Erythrozytenkonzentraten mehr älteres Blut transfundierten als die anderen beiden Gruppen. Zudem waren die Erythrozytenkonzentrate von Marik et al. nicht leukozytendepletiert. Insgesamt waren bei diesen Studien die Fallzahlen sehr gering.

Kiraly et al. fanden bei schwer verletzten Trauma-Patienten nach Verabreichung von mehr als 21 Tage gelagertem Blut eine signifikante Abnahme der Gewebe-O₂-Sättigung (mittels Nahinfrarotspektroskopie gemessen). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein vergleichbarer Abfall in der Gruppe, welche frischeres Blut erhalten hatte. Einschränkend zu diesen Beobachtungen sei zu erwähnen, dass die Gruppe um Kiraly die Gewebe-O₂-Sättigung

lediglich bis zu vier Stunden nach erfolgter Transfusion bestimmte. In der Veröffentlichung wurde keine Angaben zu der Menge der transfundierten Erythrozytenkonzentrate gemacht (196).

Tierexperimentell ergaben sich Hinweise, dass die Transfusion länger gelagerten Blutes zu einer Einschränkung der mikrovaskulären Perfusion, insbesondere zu einer Verminderung der FCD (functional capillary density) und der Gewebeoxygenierung führen könnte. Die Einschränkungen durch länger gelagertes Blut sind bei extremen Anämien und niedrigen Perfusionsdrücken deutlich ausgeprägt (288, 355). Ergänzend zu den Ausführungen in den Kapiteln „Verformbarkeit und Strömungsverhalten“ und „Aggregation und Strömungsverhalten“ sei hier eine Zusammenfassung einer Studie von Yalcin et al. erwähnt, in welcher mittels intravitaler Mikroskopie an einem M. cremaster-Modell von Ratten das Strömungsverhalten von leukozytendepletiertem, in CPDA-1 gelagertem Rattenblut beobachtet wurde. Nach 14 Lagerungstagen wiesen die gelagerten Erythrozyten einen verminderten EI, eine verminderte Resistenz gegenüber osmotischem Stress, ein erhöhtes MCV und eine erhöhte Aggregabilität auf. Infolge einer Austauschtransfusion mit den gelagerten Rattenerythrozyten fanden sich ein erhöhter arterieller pO_2 und ein verminderter arterieller pCO_2 . Bei den weiteren mikrozirkulatorischen Untersuchungen zeigte sich, dass nach Hämodilution die Durchmesser der beobachteten Arteriolen (Gefäße zwischen 24 und 38 μm) dilatiert waren. Anschließende Austauschtransfusion mit frischen Rattenerythrozyten konnte die Vasodilatation aufrechterhalten, wohingegen es nach Austauschtransfusion von gelagerten Erythrozyten zu einer Vasokonstriktion kam. Die Tiere, welche gelagerte Erythrozyten transfundiert bekamen, zeigten geringere Blutströmungen und eine verminderte O_2 -Belieferung in der Mikrozirkulation. Weiterhin beobachteten Yalcin et al. nach Transfusion gelagerter Erythrozyten eine verkleinerte zellarme/zellfreie Plasmalage, welche zudem größere zeitliche Variationen im Vergleich zur Transfusion mit frischen Erythrozyten zeigte. Gelagerte Erythrozyten fanden sich uneinheitlich über das Blutgefäß verteilt, zudem wiesen im Vergleich zu frischen Erythrozyten nur wenige gelagerte Zellen ein parallel zur Gefäßwand ausgerichtetes Strömungsprofil auf. Im Vergleich zu frischen zeigten gelagerte Erythrozyten ein vermehrtes „tumbling“ (Taumeln) in der Strömung. Dieses erklärt vermutlich auch die beobachtete große Variation der Wandschergeschwindigkeit. Die physiologischen durch Scherung induzierten Signale an die Gefäßwand werden so möglicherweise kupiert, sodass es zu keiner Vasodilatation kommt (391).

Schwer kranke Patienten sind wahrscheinlich im Besonderen aufgrund ihrer zugrunde liegenden Erkrankung anfällig gegenüber während der Lagerungszeit von Blutprodukten auftretenden negativen Faktoren. In einem Tierversuch zeigte sich bei septischen Tieren eine erhöhte Mortalität nach Verabreichung älteren Blutes. Daneben wurden im Vergleich zur Verabreichung jüngeren Blutes eine schwerere Lungenschädigung, eine stärkere Ausprägung eines Schocks sowie erhöhte pulmonalarterielle Drücke beobachtet (327).

Meist werden in der Praxis die am längsten gelagerten Erythrozytenkonzentrate bzw. das am längsten gelagerte Vollblut transfundiert. Bei Bluttransfusionen im Rahmen eines Schocks kann mit Verwendung von alten Erythrozytenkonzentraten keine Verbesserung der O₂-Gewebe-Sättigung erzielt werden, wie sich experimentell zeigte (332).

5.9. Immunologie

Immunologische Veränderungen sind für einen Teil der negativen Auswirkungen von Bluttransfusionen verantwortlich. Als Folge von Transfusion kann es zur Induktion von Entzündungen oder gegenteilig zu einer Immunsuppression (TRIM = transfusion related immunomodulation) (349) und/oder zu einer Hyperkoaguabilität kommen. Gerade bei kritisch kranken Patienten wird dieses begünstigt, sofern durch die zugrunde liegende Krankheit (z. B. Sepsis oder Trauma) neutrophile Granulozyten sensibilisiert werden und diese mit den transfundierten Blutbestandteilen reagieren. Dieses Phänomen wird auch als Zwei-Insult-Modell beschrieben. Der erste Insult (die zugrunde liegende – entzündliche – Erkrankung) bereitet die Voraussetzung des Immunsystems des Patienten für den zweiten Insult, die Aktivierung des Immunsystems auf die transfundierten Blutbestandteile (333). Eine Leukozytendepletion kann das Risiko einer TRIM reduzieren (330, 333).

Vor allem an der Membran der Erythrozyten vollziehen sich während der Lagerung zahlreiche Veränderungen (siehe Kapitel „Verformbarkeit und Veränderungen an der Zellmembran, oxidative Veränderungen und Vesikulation“). Veränderte oder beschädigte Membranproteine können zur Generierung von Neoantigenen führen, welche das Immunsystem des Empfängers aktivieren und die Bildung von Allo- oder Autoantikörpern bedingen (65). Gerade nach wiederholten Transfusionen ist das Risiko für die Bildung von Erythrozytenantikörpern erhöht.

Vornehmlich durch oxidativen Stress hervorgerufen, kommt es zu Veränderungen der Konformation der Aminosäuren in den N-terminalen und C-terminalen Regionen der Membrandomäne von Protein Bande 3. Dieses führt zur Generierung eines spezifischen

Neoantigens, an welches sich autologes IgG und möglicherweise auch die C3-Fraktion des Komplementsystems binden können (190, 192). IgG und C3 sind starke Opsonine für den Complement Rezeptor 1 (CR1) der Phagozyten. Ihre Bindung begünstigt vermutlich die Phagozytose der so markierten Erythrozyten in der Zirkulation (12, 62-65, 192, 204, 385).

Zudem können durch die Strukturveränderungen von Protein Bande 3 antigenetische Veränderungen in Rhesus-Proteinen auftreten und möglicherweise kommt es zu einem Verlust von Schutzrezeptoren wie CD47 (64) bzw. zu konformationellen Veränderungen an Protein CD47 (89). CD47 signalisiert dem Immunsystem die körpereigene Zugehörigkeit, bei Verlust dieses Rezeptors könnten entsprechende Zellen vom Immunsystem als körperfremd identifiziert werden (64). Veränderungen der Konformation von Protein CD47 können die Bindung an Thrombospondin-1 triggern und so die Bindung an Makrophagen begünstigen (89).

Mit Aufhebung der asymmetrischen Lipidverteilung in der Lipiddoppelschicht gelangt negativ geladenes Phosphatidylserin (PS) in das äußere Blatt. Neben erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen und einer Abnahme der ATP-Spiegel (Inhibierung der Flippase und Aktivierung der Scramblase) spielen vielleicht auch die Aktivierung der Enzyme Sphingomyelinase, Caspase und Calpaine hierbei eine Rolle (65). Die Expressierung von PS auf der Membranoberfläche scheint ein zusätzliches Signal für die Einleitung der Phagozytose zu sein (65, 234).

Bezüglich des zeitlichen Auftretens und der Quantität derartiger Veränderungen bestehen zwischen verschiedenen Untersuchungsgruppen Diskrepanzen (333). Kriebardis et al. beobachteten bei nicht-leukozytendepletierten CPDA-Blut eine zunehmende Aggregation sowie Abnahme von Protein Bande 3 und ebenfalls eine zunehmende Bindung von IgG. Letztere zeigte sich mit Ende der 43-tägigen Lagerung ausgeprägter (204). Kay fand bei nur einem geringen Prozentsatz gelagerter Erythrozyten eine IgG-Bindung. Die Menge an IgG war für eine suffiziente Registrierung durch Makrophagen jedoch zu gering (62, 192). Dinkla et al. beobachteten in den ersten Lagerungswochen einen Anstieg der IgG-Bindung, im weiteren Lagerungsverlauf jedoch wieder einen Rückgang der IgG-Bindung. *In vivo* gealterte Erythrozyten weisen dagegen einen überproportional hohen Gehalt an IgG auf (65, 192). Relevy et al. beobachteten während einer 42-tägigen Lagerung von nicht-leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten eine zunehmende Externalisierung von PS an die Membranoberfläche (301). Auch andere Gruppen registrierten eine deutliche Zunahme von PS an der Erythrozytenoberfläche als auch an der Oberfläche von Vesikeln während der Lagerung (333). Im Gegensatz dazu konnten Bennett-Guerrero et al. keine

signifikante Veränderung der PS-Expression bei leukozytendepletierten, in AS-3 gelagerten Erythrozytenkonzentraten feststellen (49). Verhoeven et al. sahen trotz signifikanter Aktivitätsabnahme der Flippase nur bei 1,5 % (SD 0,3 %) von in SAG-M gelagerten Erythrozytenkonzentraten nach einer fünföchigen Lagerung eine Exprimierung von PS auf der Zelloberfläche (362). Almizraq hingegen fanden mit durchflusszytometrischen Bestimmungen eine Abnahme von PS in der Membran von leukozytenreduzierten, in SAG-M gelagerten Erythrozyten, zudem konnten sie keine Veränderung von CD47 feststellen (5). Karon et al. registrierten zunächst einen Rückgang von CD47 innerhalb der ersten Lagerungswochen. Gegen Ende einer fünföchigen Lagerung beobachteten sie dann einen Anstieg von CD47 auf der Erythrozytenmembran (191).

Mit einer zukünftigen Verbesserung der Untersuchungsmethoden werden sich hoffentlich genauere Aussagen über die immunologischen Veränderungen tätigen lassen.

In den Transfusionseinheiten kommt es zur Akkumulierung von Abbauprodukten (65). Dazu zählen auch die während der Lagerungszeit abgescherten Vesikel. Veränderte Membranoberflächen von Erythrozyten und Vesikeln, wahrscheinlich auch die Externalisierung von PS, begünstigen die Thrombozytenaktivierung und wirken prokoagulatorisch (39, 116, 141, 147, 214, 306, 307, 333). So scheint nach der Transfusion von länger gelagerten Erythrozyten das Risiko für die Entwicklung einer tiefen Venenthrombose erhöht zu sein (141). Auch werden von Thrombozyten während der Lagerungszeit Vesikel abgeschert, welche im Besonderen ein prokoagulatorisches Potential aufweisen (147). Ein geringer Prozentsatz an Thrombozyten verbleibt trotz Filtration in den Blutkonserven (280, 302). Daneben wirken Mikrovesikel proinflammatorisch und immunmodulatorisch (63, 147, 333). Durch oxidativen Stress veränderte Lipide und andere Abbauprodukte, welche größtenteils über Mikrovesikel aus den Erythrozyten abgesondert werden, sowie bioreaktive Phospholipide, führen vermutlich zu proinflammatorischen und/oder prokoagulatorischen Reaktionen und können das Gefäßendothel schädigen (65, 109, 306, 333). Einige Vesikel enthalten auf ihrer Oberfläche das Protein CD47, welches dem Organismus die Zugehörigkeit vermittelt. Möglicherweise umgehen derartig markierte Mikrovesikel ihrer Entfernung durch das Immunsystem des Transfusionsempfängers (109). Auch in gelagerten leukozytendepletierten Blutkonserven lassen sich Veränderungen von Mikro-RNAs nachweisen, welche vermutlich von residuellen Leukozyten und Thrombozyten stammen (89).

Die Belastung mit größeren Mengen an Häm, Eisen und freien Hb kann ebenfalls zur Aktivierung immunologischer Prozesse führen (321, 333). Häm, Eisen und Hb begünstigen Schäden durch Redox-Reaktionen. Hb kann eine Fenton-Reaktion (das ist eine durch Eisensalze katalysierte Oxydation organischer Substrate (383)) induzieren (214). Eisen stimuliert mononukleäre Zellen zur Sekretion der Cytokine $\text{TNF } \alpha$ und IL-1 und des Chemokins IL-8 (333). Cytokine stimulieren Granulozyten (198). Sofern Granulozyten aktiviert werden, können sie biochemische, mechanische und morphologische Veränderungen durchlaufen. Morphologisch veränderte Granulozyten führen möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der mikrozirkulatorischen Blutströmung (30).

Infolge von Transfusionen beobachteten einige Untersucher Veränderungen von zahlreichen Cytokinen wie erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-8, Phospholipase-A2 und eine Abnahme von $\text{TNF } \alpha$ im Empfängerorganismus (109). Jiawji et al. hingegen fanden nach Transfusion von durchschnittlich 1,4 Einheiten leukozytendepletierter Erythrozytenkonzentrate an intensivmedizinisch versorgte Patienten keine signifikante Erhöhung von Interleukinen, Interferon- γ , $\text{TNF } \alpha$, CRP, löslichem L-Selectin und der neutrophilen Elastase innerhalb von 24 Stunden post transfusionem, jedoch eine Abnahme von IL-8 (184). Ebenfalls eine Abnahme von IL-8 registrierten Sugiura et al. nach Austauschtransfusion bei Neugeborenen mit einer nekrotisierenden Enterocolitis (340). Bennett-Guerrero et al. konnten in gelagerten leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten nur geringe Spiegel von IL-6, IL-8, IL-1 β und $\text{TNF } \alpha$ messen und sie konnten während der 42-tägigen Lagerungszeit keinen Anstieg der Interleukine beobachten (49).

Transfundierte Erythrozyten zeigen eine erhöhte Adhäsion an die Gefäßendotheloberfläche und an andere Zellen (65, 84, 301, 333). Oxidativer Stress fördert die Adhäsionsneigung der Erythrozyten an Endothelzellen (394). Relevy et al. beobachteten mittels Strömungs-Perfusions-Modellen *in vitro* eine verstärkte Adhäsion von gelagerten Erythrozyten an künstlich gezüchtete vaskuläre Endothelzellen. Zudem nahm die Anzahl der adhärenenten Erythrozyten mit Dauer der Lagerungszeit zu, ebenso die Stärke der Adhäsion (301). Eine Leukozytendepletion vor der Lagerung kann die Anzahl der adhärenenten Erythrozyten vermindern, doch nicht gänzlich aufheben. Die Stärke der Adhäsion ist vermutlich noch ausgeprägter, sofern im Empfängerorganismus inflammatorische Konditionen bestehen sollten (333). Der Pathomechanismus für die erhöhte Adhäsionsneigung ist nicht genau bekannt. Möglicherweise besteht ein

Zusammenhang mit der Externalisierung von PS. Oder es kommt zur Exprimierung bestimmter Adhäsionsmoleküle (84, 333, 395). Eventuell liegt aber auch ein Depletions-Interaktions-Mechanismus ähnlich dem des *Depletions*-Modells der Aggregation zu Grunde (396). Möglicherweise wirkt sich auch die Clusterbildung von Protein Bande 3 fördernd auf die Adhäsion an das Endothel aus (395). Eine verstärkte Erythrozytenadhäsion an das Endothel steht mit proinflammatorischen Auswirkungen in Verbindung. Das externalisierte PS scheint an der Entzündungsreaktion des Gefäßendothels beteiligt zu sein (395). In der Studie von Relevy et al. zeigte sich eine Korrelation zwischen der Erythrozytenadhäsion an künstlich gezüchtete Endothelzellen und der PS-Translokation an die Zelloberfläche der gelagerten Erythrozyten (Korrelationskoeffizient $r = 0,691$ und $p = 0,00003$) (301). Konträr zu den Ergebnissen von Relevy et al. fanden Bennett-Guerreo et al. keine signifikante Externalisierung von PS und keine erhöhte Adhäsion gelagerter Erythrozyten an Endothelzellen (49). Diese diskrepanten Beobachtungen zwischen den beiden Gruppen könnten möglicherweise darin begründet sein, dass Bennett-Guerrero et al. eine Leukozytendepletion durchführten, Relevy et al. hingegen nicht. AS-3 mag sich zudem als besseres Konservierungsmedium als CPD darstellen.

Bluttransfusionen stehen in seltenen Fällen in Zusammenhang mit der Entwicklung einer transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI = transfusion-related acute lung injury). Die Pathogenese der TRALI ist nicht vollständig verstanden. Nach dem Zwei-Insult-Modell kommt es zunächst durch die Grunderkrankung zu einer Sensibilisierung des Empfängerorganismus, mit Transfusion erfolgt dann die Aktivierung des Immunsystems (neutrophile Granulozyten) (19, 137, 214). Möglicherweise sind Alloantikörper gegen humanes Leukozyten-Antigen (HLA) oder Alloantikörper gegen neutrophile Antigene (137) oder gegen den Lipophospholipid-Platelet-Activating-Faktor (PAF) (322, 333) an der Ausbildung der TRALI involviert. In seltenen Fällen kann es zu febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktionen kommen, welche möglicherweise durch das Alter des transfundierten Blutes begünstigt werden (158).

Die Immunsuppression des Empfängerorganismus ist vermutlich auch für das vermehrte Auftreten von Carcinom-Rezidiven und das vermehrte Auftreten von Infektionen nach Bluttransfusionen verantwortlich (18, 365). Die durch Transfusionen induzierte Immunsuppression scheint auch für eine bessere Transplantattoleranz verantwortlich zu sein, sofern Bluttransfusionen vor oder während einer Organtransplantation verabreicht werden (306).

Erythrozyten sind in einen immunologischen Bereinigungsprozess (immune adherence clearing) mit eingebunden. Die roten Blutzellen verfügen über die Fähigkeit, Mikroben, Immunkomplexe sowie weitere inflammatorisch wirkende Partikel zu binden und diese zu Makrophagen in der Leber und der Milz zu transportieren. Bei diesem Prozess werden von Komplementfaktoren opsonierte Immunkomplexe oder Partikel durch den Complement-Rezeptor 1 (CR1, CD 35) an den Erythrozyten gebunden (144). Auch ist das Duffy-Antigen der Erythrozyten in einen Bereinigungsprozess von Chemokinen eingebunden. Während der Lagerung von humanen Erythrozyten kommt es zu einem Rückgang der Duffy-Antigen-Expression und dadurch zu einer Verminderung der Chemokin-Bereinigungsfunktion (232).

5.10. Posttransfusionsüberleben

Bis zu 30 % der transfundierten Erythrozyten werden innerhalb der ersten 24 Stunden nach erfolgter Transfusion aus der Zirkulation des Empfängerorganismus entfernt (62, 64, 230). Mit zunehmender Dauer der Lagerungszeit erhöht sich die Anzahl an Erythrozyten, die aus der Zirkulation entfernt werden (230).

Das Überleben der Erythrozyten lässt sich z. B. durch eine radioaktive Isotopenmarkierung der roten Blutzellen und anschließender Detektion im Empfängerorganismus bestimmen. Am geläufigsten ist die Markierung mit ^{51}Cr (200, 254). Das mittlere 24-Stunden Überleben post transfusionem von 35 Tage in CPDA-1 gelagerten Erythrozyten liegt bei durchschnittlich 79 % (SD \pm 10 %) (200). Die Food and Drug Administration (FDA, USA) setzt als Standard eine „Überlebensrate von mehr als 75 % von radioaktiv-markierten Erythrozyten nach der Infusion in autologe Spender“ voraus (205).

In einigen Studien konnte eine verminderte Verformbarkeit, eine erhöhte osmotische Fragilität oder die Formveränderung von Diskozyten zu Echinozyten und Sphärozyten mit dem Posttransfusionsüberleben der Erythrozyten korreliert werden (4, 12, 75, 83, 150). Möglicherweise kommt es durch die eingeschränkte Verformbarkeit zu einer Sequestrierung entsprechender Erythrozyten in der Milz des Empfängerorganismus (395). Von der Gruppe um Deplaine et al. wurde ein System entwickelt, dass eine artifizielle humane Milz darstellt. Leukozytendepletierte und in SAG-M gelagerte Erythrozyten zeigten nach drei bis sechs Lagerungswochen eine Sequestrierung von 30,6 % in diesem System. Einhergehend fand sich eine Abnahme des mit dem LORCA[™] gemessenen

Elongationsindex. In dieser Studie wurde jedoch die Anzahl der in der künstlichen Milz sequestrierten Erythrozyten nicht mit dem Elongationsindex korreliert (105).

Auch physiologisch *in vivo* gealterte Erythrozyten scheinen im Vergleich zu jüngeren Erythrozyten eine verminderte Verformbarkeit aufzuweisen. Bei Untersuchungen an nach ihrer Dichte separierten Erythrozyten konnten Hardemann und Ince beobachten, dass dichtere, d. h. ältere Zellen, eine geringere Verformbarkeit zeigen als weniger dichte, d. h. jüngere Erythrozyten. Die von Hardeman und Ince beobachtete Einschränkung der Verformbarkeit stellte sich jedoch nur bei niedrigen Scherspannungen (< 5 Pa) als signifikant dar, bei der höchsten gemessenen Scherspannung von 30 Pa hingegen nicht (154). Eine eingeschränkte Verformbarkeit und die erhöhte Aggregation alter Erythrozyten lassen eine Sequestrierung von Erythrozyten am Ende ihrer Lebensspanne in der Milz wahrscheinlich erscheinen.

Betrachtet man jedoch die relativ genau terminierte Lebenszeit der humanen Erythrozyten von 120 Tagen in der menschlichen Zirkulation, so lässt sich vermuten, dass am terminalen Ende des Erythrozytenlebens ein schneller Prozess mit Modifikationen bestimmter Moleküle zur Einleitung der Eryptose erfolgen muss (11, 135). Die Konformationsänderung von Protein Bande 3 mit anschließender Bildung eines Neoantigens, Bindung von IgG und C3-Komplement sowie die Externalisierung von PS stehen höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit der Registrierung durch Phagozyten. Daneben kann es durch Stimulierung von Prostaglandin E₂ mit Aktivierung eines Ca²⁺-permeablen Kationen-Kanals zur Aktivierung des Gardos-Kanals mit konsekutivem Volumenverlust des Erythrozyten kommen. Diese Mechanismen werden derzeit als *in vivo* physiologisch ablaufende Prozesse der Eryptose gesehen (11, 12, 14, 65, 135, 213). Eventuell sind auch ein Fas-Signalgebungs-Todeskomplex und/oder eine Caspase-Aktivierung für die Eryptose der Erythrozyten mitverantwortlich. Der Fas-Rezeptor ist ein TNF-Rezeptor und initiiert infolge seiner Bindung die Apoptose der entsprechenden Zelle (382). Möglicherweise begünstigt die Fragmentierung und Clusterbildung von Protein Bande 3 die Einleitung eines Fas- oder Caspase-induzierten Zelltodprogrammes. Eine verlängerte Lagerungszeit ist mit Modifikationen in Fas-assoziierten Proteinen und einer Caspase-Aktivierung in Erythrozyten und Vesikeln assoziiert (204). Calpain und Caspase-Inhibitoren dienen vermutlich als Schutzfaktoren vor der Eryptose. Neben intrazellulär erhöhten Ca²⁺-Konzentrationen können auch Membranzustrukturen sowie die Oxidierung von Hb zu einer Caspase-Aktivierung führen (11, 12).

Die Bedeutung der ATP-Konzentration auf das Posttransfusionsüberleben wird seit langem kontrovers diskutiert. Erstmals beschrieb Rapoport 1947 eine Assoziation zwischen dem ATP-Gehalt und der Lebensfähigkeit der gelagerten Erythrozyten (200). Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen der ATP-Konzentration und einem verminderten Überleben der Erythrozyten nach der Transfusion im Empfängerorganismus, sofern die intrazelluläre ATP-Konzentration auf unter 50 % der physiologischen Spiegel gesunken ist (355, 387). So beschrieben Dern et al. eine Korrelation zwischen der ATP-Konzentration und dem Überleben der Erythrozyten nach erfolgter Transfusion, jedoch nur bei äußerst niedrigen ATP-Konzentrationen (106). Beutler und Wood benannten eine ATP-Konzentration von $> 1,5 \mu\text{mol/g Hb}$ als Voraussetzung für suffiziente Überlebensraten transfundierter Erythrozyten (55). Högman et al. hingegen konnten keine Korrelation zwischen dem ATP-Gehalt der Erythrozyten und ihrer Lebensfähigkeit im Empfängerorganismus nach der Transfusion beobachten. Andere Gruppen fanden nach Rejuvenation ATP-depletierter Erythrozyten mit Erhöhung der ATP-Konzentrationen auf physiologische Werte ein deutlich verbessertes Posttransfusionsüberleben (388). Wood et al. beobachteten im Gegensatz dazu bei gelagerten Erythrozyten mit anschließender Rejuvenation und Erhöhung der ATP-Konzentration auf physiologische Werte kein besseres Posttransfusionsüberleben im Vergleich zu Erythrozyten mit verminderten ATP-Konzentrationen (389).

Die von Matthes et al. mit dem Apheresesystem MCS 3P[®] gewonnenen leukozyten-depletierten Erythrozytenkonzentrate zeigten über eine Lagerungszeit von 42 Tagen in SAG-M eine bessere Bewahrung der ATP-Konzentrationen im Vergleich zu konventionell gewonnenen Erythrozytenkonzentraten (240). Regan et al. konnten bei mit dem MCS 3P[®] gewonnenen Erythrozytenkonzentraten nach 35 Lagerungstagen in SAG-M kein höheres Posttransfusionsüberleben im Vergleich zu konventionell gewonnenen Erythrozytenkonzentraten registrieren (298).

Mit dem heutigen Stand der Wissenschaft lässt sich nicht eindeutig klären, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der ATP-Konzentration und dem Überleben der Erythrozyten gibt. Inwiefern sich der ATP-Mangel durch Beeinflussung der ATP-abhängigen Prozesse der Zelle, d. h. Kationentransporter, Translokasen, Phosphorylierung auf das Posttransfusionsüberleben auswirkt, bleibt spekulativ. In der vorliegenden ABC-Studie fand sich eine signifikante Assoziation zwischen der intrazellulären ATP-

Konzentration und der Erythrozytenverformbarkeit bei hohen Scherspannungen, sofern der ATP-Gehalt unter $2,5 \mu\text{mol/g}$ Hb abgesunken war (189). Denkbar wäre, dass die Assoziation zwischen dem verminderten Posttransfusionsüberleben und dem ATP-Abfall auf unter 50 % der physiologischen Werte durch eine eingeschränkte Flexibilität der Erythrozyten bedingt ist. In der ABC-Studie bestand die signifikante Assoziation lediglich bei hohen Scherspannungen. In der Mikrozirkulation sind Scherspannungen von 3 bis 5 Pa vorherrschend (284). So bleibt es spekulativ, ob dieser Zusammenhang von klinischer Relevanz wäre.

Ein weiterer möglicher Zusammenhang zwischen einer stark reduzierten ATP-Konzentration und nicht nur einem reduzierten Posttransfusionsüberleben sondern auch einer erhöhten Morbidität/Mortalität der Empfänger könnte in der Einbindung der Erythrozyten in die Autoregulation der mikrozirkulatorischen Strömungsverhältnisse bestehen. Die Freisetzung von ATP aus Erythrozyten ist in die Gefäßtonusregulation der kleinen Arterien und Arteriolen mit eingebunden. Näheres hierzu siehe im Kapitel „ATP und NO“.

Unter Betrachtung der teils diskrepanten Ergebnisse scheint ein basaler Spiegel von ATP oder ein ausreichender Pool an Adenin-Nukleotiden (AMP, ADP und ATP) notwendig zu sein, um die Zellintegrität, die Lebensfähigkeit und die Funktion der Erythrozyten nach erfolgter Transfusion zu gewährleisten (65, 170, 171, 200, 349). Ein ausreichend großer Adenin-Pool unterstützt die Erythrozyten nach Wiedereintritt in die Zirkulation vermutlich bei der Regeneration ihrer ATP-Spiegel (65, 173).

Vor dem Hintergrund der relativ großen Fraktion posttransfusional eliminierter Erythrozyten ist es ferner erstaunlich, dass einige der transfundierten Erythrozyten ein maximales Überleben von bis zu 135 Tagen (62) oder gar bis zu 144 Tagen (230) nach der Transfusion aufweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich der Alterungsprozess *in vitro* doch deutlich von dem physiologischen Alterungsprozess *in vivo* unterscheidet (230).

5.11. ATP und NO

Weitere Veränderungen, die sich während der Lagerung von Erythrozyten ereignen, beeinflussen die Funktion der Erythrozyten im Rahmen der mikrozirkulatorischen Autoregulation. Erythrozyten agieren selber als O₂-Sensoren (117, 134, 287). Sie speichern und transportieren NO und ATP (4, 227). ATP und NO sind vasoaktive Substanzen, die eine Vasorelaxation und im Falle von ATP zudem eine Vasokonstriktion vermitteln können (227). Des Weiteren wirkt ATP der Adhäsion von Erythrozyten an Endothelzellen entgegen (197).

ATP wird aus Erythrozyten als Reaktion auf Scherung, Verformung, niedrige Gewebe-O₂-Spannungen und eine abnehmende Hb-O₂-Sättigung freigesetzt (4, 117, 134, 227). Bei Scherungen unterhalb von 3 Pa erfolgt eine kontinuierliche Sezernierung von ATP aus den zirkulierenden Erythrozyten. Bei stärkeren Scherkräften und Verformungen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von ATP. Die Menge der ATP-Freisetzungen ist vermutlich ab Schergeschwindigkeiten oberhalb von 3 Pa proportional zur Größe der Scherung. An der kontinuierlichen Freisetzung von ATP ist wahrscheinlich der Pannexin-1-Kanal beteiligt. Die Sezernierung von ATP als Reaktion auf Verformungen und höhere Scherkräfte erfolgt vermutlich über den CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (134). Nach Gov und Safran besteht die Hypothese, dass es durch lokale Zellverformungen zu einer Dissoziation von Spektrin-Molekülen von Aktin kommt. Das durch diese Defekte partiell freigesetzte Aktin kann den CFTR binden und aktivieren (79, 134). Zudem gibt es vermutlich einen cAMP-vermittelten Aktivierungsprozess von CFTR (227). Neben Scherung und Verformung kommt es in Abhängigkeit vom Grad der Oxygenierung des Hbs zu einer Freisetzung von ATP (4, 197, 227, 315). Ein möglicher Mechanismus wäre, dass bei Hypoxie durch Konformationsänderung von Hb, d. h. Veränderung von der R-Konformation (oxygeniertes Hb) zur T-Konformation (des-oxygeniertes Hb), die glykolytischen Enzyme von der zytoplasmatischen Domäne des Proteins Bande 3 freigesetzt werden. Konsekutiv wird über die dadurch beschleunigt ablaufende Glykolyse vermehrt ATP produziert. Die erhöhten intrazellulären ATP-Konzentrationen stimulieren die Freisetzung von ATP über den CFTR (4). Eventuell wird die ATP-Freisetzung aus den Erythrozyten auch über eine rezeptorvermittelte Aktivierung von erythrozytenmembrangebundenen β -adrenergen Rezeptoren oder Prostacyclin-Rezeptoren initiiert. Nach einem Modell von Sprague et al. kommt es mit abnehmender O₂-Sättigung von Hb zur Aktivierung von G-Proteinen (G_s oder G_i), welche die Adenylyl-

Cyclase stimulieren. Die Adenylyl-Cyclase bildet cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), das wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA ihrerseits stimuliert den CFTR, der die Freisetzung von ATP initiiert (117).

Vermutlich besteht eine negative Rückkopplung der ATP-Freisetzung durch ein erhöhtes extrazelluläres Angebot an ATP, ADP oder NO/SNO (4, 117).

Kirby et al. beobachteten, dass gelagerte Erythrozyten (zwischen 36 und 42 Tage) als Reaktion auf eine Desoxygenierung weniger ATP freisetzen als frische Erythrozyten. Eine Inkubation gelagerter Erythrozyten in einer Suspension aus glykolytischen Intermediaten, Purinen und Phosphat-Vorläufern verbesserte die ATP-Freisetzung bei Desoxygenierung (197).

ATP bindet an purinerge Rezeptoren der Plasmamembran von glatten Gefäßmuskelzellen und von Endothelzellen. Es bestehen verschiedene Subklassen der purinergen Rezeptoren (P) (117, 227). Die Bindung von ATP an P_{2Y1} - und P_{2Y2} -Rezeptoren an luminalen Endothelzellen führt über die Produktion von Inositol-Triphosphat (IP_3) zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum der Endothelzellen. Die erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bewirken in den Endothelzellen die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Über die anschließende Freisetzung von NO kommt es zu einer Vasodilatation. Die Bindung purinerge Rezeptoren durch ATP stimuliert neben der Freisetzung von NO auch die Sezernierung anderer vasorelaxierenden Substanzen (117). Durch Bindung von ATP und dessen Abbauprodukte ADP und AMP an P_{2X} -Rezeptoren der Endothelzellen kann zudem direkt eine Vasodilatation initiiert werden. Gefäßendothelzellen sind selber in der Lage als Reaktion auf eine vermehrte Scherung, ATP zu produzieren und in das Gefäßlumen freizusetzen (227).

Neben Noradrenalin wird ATP als weiterer Co-Transmitter aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt. Die Bindung von ATP an P_{2X1} -Rezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen führt zu einem Einstrom vom Ca^{2+} in die Zellen. Die erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bewirken eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen und damit eine Vasokonstriktion. Über die vasokonstriktive Wirkung von ATP begünstigen möglicherweise chronisch erhöhte ATP-Konzentrationen die Entwicklung von arterieller Hypertonie und auch Arteriosklerose (227).

Uneinigkeit herrscht noch darüber, inwiefern bzw. in welcher Stärke die Abbauprodukte von ATP, d. h. ADP, AMP und Adenosin die Rezeptoren aktivieren und entsprechende Reaktion auslösen. ATP wird in der Zirkulation durch Exo-Nukleotidasen abgebaut (227).

Die Regulation der mikrozirkulatorischen Blutströmung erfolgt über die Kontraktion und Relaxierung der Arterien und Arteriolen. Der pO_2 ist aber vornehmlich in Bereich der Kapillaren und Venolen reduziert. Dementsprechend würde lokal im Bereich der Kapillaren und Venolen freigesetztes ATP keine direkte Wirkung auf den Gefäßtonus haben. Vermutlich besteht ein Mechanismus einer stromaufwärts gerichteten Informationsfortleitung (13), welche höchstwahrscheinlich über gap junctions erfolgt (183).

Möglicherweise wirkt sich die verminderte ATP-Konzentration der gelagerten Erythrozyten auf die Autoregulation der Mikrozirkulation im Empfängerorganismus aus und trägt mit zu der in einigen Studien beschriebenen auffälligen schlechten Gewebeoxygenierung, erhöhten Morbidität und Mortalität nach Verabreichung länger gelagerten Blutes bei. Vermutlich macht sich dieses insbesondere nach Transfusion mehrerer Einheiten bemerkbar. Denkbar wäre diesbezüglich auch ein Zusammenhang mit der reduzierten Überlebensfähigkeit der Erythrozyten, sofern ihr ATP-Gehalt unter 50 % der physiologischen Konzentration liegt.

NO wird überwiegend von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) synthetisiert. Daneben verfügen auch die Erythrozyten über eine NO-Synthase (NOS). Zum anderen kann NO aus Nitrit gebildet werden. Die Generierung von NO erfolgt in Endothelzellen und in den Erythrozyten (61). Die Eisenbindungsstelle des Häms hat gegenüber NO eine um ca. 8000-mal höhere Affinität als gegenüber O_2 (176). Dieses bedeutet, dass freies NO äußerst schnell durch Hb gebunden wird und so keine bioaktive Wirkung entfalten kann. Ein Anteil des NO liegt als bioaktives NO in Form von S-Nitrosithiol (SNO) vor. Die Thiol-Gruppe schützt NO vor der Absammlung durch die Bindungsstellen des Häms.

Neben der Eisenbindungsstelle des Häms kann NO auch an den $\beta 93$ -Cystein-Rest auf den β -Polypeptidketten des Hb-Moleküls in Form von S-Nitrosithiol (SNO) gebunden werden. Dabei wird vermutlich NO zunächst an Desoxy-Hb gebunden. Während der Oxygenierung von Hb erfolgt die Übertragung von NO auf $\beta 93$ -Cystein (Transnitrosylation). Oxidiertes Hb (R-Konformation) hat eine höhere Bindungsaffinität für SNO. Bei Freisetzung von O_2

und Desoxygenierung von Hb (T-Konformation) ist die Bindungsaffinität gegenüber SNO reduziert und SNO kann leichter freigesetzt werden. D. h. mit Freisetzung von O₂ in hypoxischem Gewebe kann auch SNO freigesetzt werden (3, 109, 294). Desoxy-Hb dient möglicherweise als Nitrit-Reduktase. So kann Nitrit in NO umgewandelt werden (117).

Der Transport von SNO in den Zellen und im Extrazellularraum erfolgt ebenfalls über die Transnitrosylation, indem NO von einem Thiol auf ein anderes Thiol übertragen wird.

An seinen Erfolgszellen stimuliert NO die cytosolische Guanylat-Cyclase, welche in ihrer Aktivität durch die Reaktion mit NO um ein Vielfaches verstärkt wird. Die Guanylat-Cyclase katalysiert die Bildung von cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) (24, 294, 324). cGMP ist ein Mediator vieler verschiedener biologischer Reaktionen und aktiviert cGMP-abhängige Protein-Kinasen. Aktivierte Protein-Kinasen bewirken an der glatten Gefäßmuskulatur eine Relaxation (324).

In gelagerten Erythrozyten fällt bereits innerhalb der ersten Lagerungsstunden die Konzentration von SNO (49, 109, 287). Zusammen mit dem verminderten ATP-Gehalt bedeutet der verminderte Gehalt von SNO, dass die vasoregulatorische Funktion der Erythrozyten reduziert oder sogar aufgehoben ist. Zudem scheint NO einen direkten Einfluss auf die mechanischen Funktionen der Erythrozyten zu haben. Inhibierung der erythrozytären NOS führt zu einer Verminderung der Verformbarkeit. NO-Donatoren können eine Erhöhung der Erythrozytenverformbarkeit bewirken (61, 324).

Neben seiner Bedeutung auf den Gefäßtonus und die Verformbarkeit wirkt NO der Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten entgegen und wirkt antioxydativ (109, 355). Eine erniedrigte NO-Konzentration der transfundierten Erythrozyten könnte das Auftreten intravasaler Thromben begünstigen und die Adhäsion und Diapedese von Leukozyten fördern (349). Ein zusätzlich potentiell erhöhtes Angebot an ADP als Abbauprodukt von ATP könnte das Risiko für die Generierung intravasaler Thromben erhöhen.

Inwiefern das durch die Hämolyse freigesetzte Hb sowie Mikrovesikel freies NO binden und damit eine zusätzliche Beeinträchtigung der autoregulatorischen Funktionen bewirken, bleibt fraglich (49), wobei einige Untersuchungsgruppen ein vermehrtes „scavenging“ (Abräumen) von NO durch zirkulierende Mikropartikel von gelagerten Erythrozyten sehen (89, 224, 391).

Die als alternative Blutersatzprodukte entwickelten auf Hb-basierten O₂-Träger (HbOC) zeigen vasokonstriktive Effekte (374) und waren im praktischen Einsatz mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert. Als Ursache für die negativen Auswirkungen wurde die verstärkte Bindung von NO durch das in ihnen enthaltene Hb diskutiert. Dieses ist nicht durch eine Zellmembran konserviert und daher leicht für eine Bindung mit NO zugänglich (309, 353).

5.12. Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich nicht eindeutig beantworten, inwiefern und ob die nur leichten Veränderungen der Verformbarkeit und der Aggregation sich wesentlich auf die Funktionen der Mikrozirkulation auswirken und ob eine leicht verminderte Aggregation – wie in der ABC-Gruppe – positive oder negative Auswirkungen *in vivo* hat.

Mit dem heutigen Stand der Wissenschaft ist nicht eindeutig zu sagen, was für einen „Gesamteffekt“ eine veränderte Aggregation auf die Strömungsverhältnisse und auf die Gewebepfusion ausübt. Hat die Aggregation einen positiven oder negativen Einfluss? Gibt es eine optimale Stärke der Aggregation? Sollte eine veränderte Aggregation therapiert werden (32)? Auch ist bisher nicht eindeutig geklärt, ab welchem Grad eine verminderte Verformbarkeit relevante Auswirkungen auf die Hämodynamik zeigt. Die Interaktionen zwischen den rheologischen Eigenschaften des Blutes und der Hämodynamik sind außerordentlich komplex. Unter normalen Voraussetzungen kann die Mikrozirkulation mit ihrer bemerkenswerten Autoregulation wahrscheinlich leichte rheologische Veränderungen gut kompensieren. Diese Kompensationsmöglichkeiten können aber unter pathologischen Bedingungen, z. B. bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen, im Zustand einer Anämie, bei Herzinsuffizienz u. a. möglicherweise stark beeinträchtigt sein (30).

Daneben haben die während der Lagerung ablaufenden immunologischen Veränderungen sowie die Akkumulierung von Abbauprodukten in den Transfusionseinheiten einen bedeutenden Einfluss auf die Qualität von Blutprodukten, tragen wahrscheinlich zu den negativen Auswirkungen mit bei (65) und beeinflussen z. T. auch das Strömungsverhalten des Blutes.

Die Ergebnisse vieler Studien sind teilweise widersprüchlich und es bestehen methodische Einschränkungen. In Anbetracht der vermutlich schwerwiegenden Komplikationen bzw. Folgen von Bluttransfusionen, sind weiterführende Studien äußerst wichtig. Bluttransfusionen stellen lebensrettende Interventionen dar. Bei potentiell gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Bluttransfusionen sollte die gängige Transfusionspraxis überdacht werden. Die Optimierung gelagerter Blutprodukte bzw. die Verbesserung deren Qualität beruhte bisher vornehmlich auf dem Ziel, die Lagerungszeit weiter auszuweiten, um – aus ökonomischen Gründen – das Verwerfen von abgelaufenen Blutprodukten zu vermeiden bzw. im Rahmen der autologen Blutspende die Regenerationszeiten einhalten bzw. ausdehnen zu können. Die aktuell verwendeten Qualitätsparameter für Blutprodukte werden in Zukunft vermutlich nicht mehr ausreichend die Qualität von gelagerten Erythrozyten beschreiben können. Die Bestimmung rheologischer Parameter liefert eine

gute Erweiterung zur Qualitätsbestimmung, auch wenn es bisher noch schwierig erscheint, die sich während der Lagerungszeit ereignenden leichten Veränderungen klinisch einzuordnen. Zudem müsste sich in Zukunft weiter mit den immunologischen Veränderungen während der Lagerungszeit und deren Auswirkungen beschäftigt werden.

Auch in der Klinik wäre ein Paradigmenwechsel zu diskutieren. So zeigte sich eine restriktivere Transfusionspraxis, d. h. die Verabreichung von Transfusionen erst bei Abfall des Hb unter 7 g/dl nicht nur gleichwertig, sondern überlegen gegenüber einer liberaleren Transfusionspraxis, d. h. Blut-/Erythrozytentransfusionen bereits ab einem Hb \leq 9 g/dl (157). Mit einem restriktiven Transfusionsregime konnte am New York Methodist Hospital die Verabreichung von Erythrozytenkonzentraten, Thrombozyten und therapeutischem Plasma (fresh frozen plasma) drastisch reduziert werden. Die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten wurde im ersten Jahr des Programms um 30,1 % und im zweiten Jahr um 37,7 % vermindert. Dabei zeigte sich eine Reduktion von transfusionsassoziierten Komplikation um 28,6 % und eine Kostenersparnis von über 2,2 Millionen US-Dollar (282). Der Verzicht auf Bluttransfusionen zeigte anhand von Erfahrungen mit den Zeugen Jehovahs, dass bei vielen unterschiedlichen operativen Eingriffen – einschließlich herzchirurgischer Operationen – die Mortalität und Morbidität gegenüber einem konventionellen Vorgehen nicht erhöht war (366).

In der vorliegenden ABC-Studie fanden sich zwischen der ABC-Gruppe und der konventionellen Gruppe keine signifikanten Unterschiede der untersuchten Lagerungsparameter. Hingegen war die Variation einiger Werte in der konventionellen Gruppe höher als in der ABC-Gruppe. Diese Beobachtung führt zu der Schlussfolgerung, dass die ABC®-MacoPharma-Waage ein besser standardisiertes Blutprodukt liefert.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Transfusion von Blutkomponenten und Vollblut ist ein essentieller Bestandteil lebensrettender und lebenserhaltender Maßnahmen. In den entwickelten Industrienationen erfolgte in den 1970er und 1980er Jahren der Übergang von der Vollblutspende zur Blutkomponentenspende. Die Vollblutspende hat jedoch weiterhin einen Stellenwert bei der autologen Eigenblutspende und in Ländern der dritten Welt, in welchen die logistischen Gegebenheiten für die aufwendige Blutkomponentenspende nicht vorliegen. Zudem gewinnt in heutiger Zeit die Verwendung von – insbesondere frischem – Vollblut im klinischen Zustand einer massiven Hämorrhagie, im schweren hämorrhagischen Schock als auch bei einer Koagulopathie wieder vermehrt an Interesse. In der transfusionsmedizinischen Forschung bestehen fortwährend Bemühungen, die Qualität von Blutprodukten stetig weiter zu verbessern und somit auch die Dauer ihrer Lagerungsfähigkeit auszuweiten.

Gibson et al. beschrieben 1956 den so genannten Sammlungsschaden („lesion of collection“). Bei der Blutsammlung in dem Antikoagulan- und Konservierungsmedium ACD zeigten die Erythrozyten in den ersten 100 ml ein deutlich geringeres Posttransfusionsüberleben als der Durchschnitt aller Erythrozyten der gesamten Transfusions-einheit. Gibson et al. führten diese Beobachtung auf die schädigende Wirkung der hohen Citrat-Konzentration der in den Blutbeuteln vorgelegten ACD-Lösung zurück (142). Später registrierten Matthes et al. bei Blutsammlung mit dem Zellseparator MCS 3P® (Haemonetics Corp., USA), einem Apheresesystem, eine bessere Bewahrung der erythrozytären ATP- und 2,3-DPG-Konzentrationen im Vergleich zur Blutsammlung mittels konventioneller Blutsammelwaagen (240). Bei der Apheresetechnik wird das gesammelte Blut kontinuierlich mit der Antikoagulan- und Konservierungs-Lösung in einem konstanten Konzentrationsverhältnis vermischt und stellt somit eine schonendere Blutsammlung dar.

Ausgehend von diesen Beobachtungen bestand die Fragestellung der vorliegenden ABC-Studie darin, ob durch die kontinuierliche Zuführung des Antikoagulan- und Konservierungsmediums CPDA-1 zum gesammelten Vollblut die Qualität des anschließend gelagerten Vollblutes besser bewahrt werden könnte als bei Vollblut, das in einen Blutbeutel mit einer vorgelegten CPDA-1-Antikoagulan- und Konservierungs-Lösung gesammelt wird. Da sich in jüngerer Zeit Studien mehrten, in welchen negative Auswirkungen von Bluttransfusionen auf den Empfängerorganismus, eine erhöhte Morbidität und Mortalität publiziert wurden, welche möglicherweise auf die intrinsischen Eigenschaften der gelagerten Erythrozyten mit Beeinträchtigung der Mikrozirkulation zurückzuführen sind,

wurden in der vorliegenden Studie rheologische Untersuchungen der Erythrozytenverformbarkeit und Erythrozytenaggregation eingeschlossen.

Material und Methoden: Die als randomisierte Kontrollstudie konzipierte Untersuchung umfasste in beiden Gruppen jeweils 20 Untersuchungseinheiten. In der ABC-Gruppe wurde Vollblut mit der ABC[®]-Waage (MacoPharma, Frankreich) gewonnen. Bei der ABC[®]-Waage wurde mittels eines Rollerpumpensystems die CPDA-1-Lösung kontinuierlich in gleichbleibender Konzentration dem gewonnen Vollblut beigemischt. Die Blutsammlung in der konventionellen Gruppe erfolgte mit der Blutentnahmewaage Compomixer M2[®] (Fresenius HemoCare, Deutschland), bei der mithilfe der Schwerkraft Spendeblood in einen mit CPDA-1-Antikoagulanzlösung vorgelegten Beutel floss. Anschließend erfolgte bei allen Untersuchungseinheiten nach zwei Stunden eine Leukozytendepletion. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 49 Lagerungstage. An den Lagerungstagen 1, 7, 21, 35, 42 und 49 wurden die Werte folgender Parameter im Vollblut bestimmt: pH-Wert, ATP, 2,3-DPG, Hämoglobin, Hämatokrit, Verformbarkeit und Aggregationsfähigkeit der Erythrozyten. Aus Plasma erfolgte die Bestimmung von freiem Hämoglobin, Glukose, Kalium sowie den Gerinnungszeiten TT, PT und aPTT, Faktor-V-Aktivität, Faktor-VIII-Aktivität, Fibrinogen, AT, D-Dimere und TAT-Komplexe. Die rheologischen Untersuchungen erfolgten mit dem LORCA[™] (R & R Mechatronics, Niederlande). Die Verformbarkeit der Erythrozyten wurde mit dem Elongationsindex, die Aggregation mit dem Aggregationsindex beschrieben. Am ersten Untersuchungstag wurde einmalig der Restleukozytengehalt der leukozytendepletierten Vollblutkonserven bestimmt. Zudem wurden die beiden Gruppen hinsichtlich der Präzision des durch die Blutwaagen erzielten Spendevolumens, der Dauer der Blutspende und der Dauer der Leukozytendepletion verglichen.

Ergebnisse: Mit beiden Blutwaagesystemen wurden annähernd gleiche Sammelvolumina erzielt, 525 (SD 5,3) ml in der ABC-Gruppe und 524 (SD 10,2) ml in der konventionellen Gruppe. Die Hb-Konzentrationen der Blutkonserven zeigten sich in beiden Untersuchungsgruppen mit 65,9 (SD 5,1) g pro Konserve in der ABC-Gruppe bzw. 67,5 (SD 7,8) g pro Konserve in der konventionellen Gruppe nahezu gleich. In der konventionellen Gruppe fanden sich jedoch eine signifikant höhere Variation der Konservenvolumina ($p = 0,006$), eine signifikant höhere Variation bei dem durch den Filtrationsprozess verursachten Blutverlust ($p = 0,0002$) und zudem eine Tendenz zu einer höheren Variation des Hb-Gehaltes pro Blutkonserve ($p = 0,07$). Die untersuchten Qualitätsparameter unterschieden sich in beiden Untersuchungsgruppen nicht signifikant.

voneinander. Die Konzentrationen von freiem Hb und K^+ wiesen in der konventionellen Gruppe eine signifikant höhere Variation auf ($p = 0,04$), die Konzentration von Glukose zeigte eine Tendenz zu einer höheren Variation in der konventionellen Gruppe ($p = 0,07$). Die mittlere ATP-Konzentration betrug am 42. Lagerungstag in der ABC-Gruppe 2,33 (SD 0,41) $\mu\text{mol/g Hb}$ versus 2,24 (SD 0,39) $\mu\text{mol/g Hb}$ in der konventionellen Gruppe. In beiden Untersuchungsgruppen fanden sich eine Abnahme der Verformbarkeit und eine Verminderung der Aggregationsneigung der Erythrozyten. Der Aggregationsindex war in der konventionellen Gruppe höher als in der ABC-Gruppe ($p = 0,056$). Bis zum 21. Lagerungstag war diese Differenz signifikant ($p = 0,03$), verminderte sich aber gegen Ende des Untersuchungszeitraumes.

Schlussfolgerung: Die klinische Einordnung der beobachteten rheologischen Veränderungen ist vor dem Hintergrund des heutigen Standes der Wissenschaft schwierig. Sowohl die Aggregationsfähigkeit als auch die Verformbarkeit der Erythrozyten bestimmen maßgeblich die Strömungseigenschaften des Blutes. Eine Abnahme der Verformbarkeit könnte zu einer vermehrten Sequestrierung der weniger flexiblen Erythrozyten in der Milz, aber auch in der Leber, der Lunge und dem Sternum führen. Bei Eintritt weniger verformbarer Erythrozyten in kleinste Blutgefäße wird ein größerer Perfusionsdruck benötigt und der Strömungswiderstand steigt an. Möglicherweise könnte es auch zu einer kompletten Verlegung kleinster Gefäße kommen, die FCD könnte sich vermindern und die O_2 -Versorgung der Gewebe eingeschränkt werden. Zudem wird bei Abnahme der Verformbarkeit durch Einschränkung des „tank-treadings“ und der Fähigkeit, sich zu Ellipsen auszudehnen, das Strömungsprofil des Blutes gestört.

Eine erhöhte Aggregationsneigung steht in Zusammenhang mit einer ungünstigen Beeinflussung des Strömungswiderstandes, des Strömungsprofils und der Blutviskosität. Bei einer verstärkten Aggregationsneigung bedarf es eines höheren Energieaufwandes, um Aggregate aufzulösen. Die FCD könnte sich vermindern und durch größere Aggregate könnten Gefäße ganz verlegt werden. Insofern könnte sich eine verminderte Aggregation durchaus günstig auf das Strömungsverhalten des Blutes und die O_2 -Versorgung in der Mikrozirkulation auswirken. Auf der anderen Seite scheint aber eine bestimmte Aggregationsstärke zur Aufrechterhaltung der mikrozirkulatorischen Perfusion notwendig zu sein. Neben rheologischen Veränderungen bestehen zahlreiche weitere, v. a. immunologische Veränderungen, welche für die negativen Auswirkungen von Bluttransfusionen verantwortlich sein könnten.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden ABC-Studie schließen, dass die ABC[®]-MacoPharma-Waage ein besser standardisiertes Blutprodukt liefert. Eine kontinuierliche Applikation der Antikoagulanzlösung CPDA-1 während der Blutsammlung bzw. ein Überschuss der Antikoagulanzlösung CPDA-1 am Beginn der Blutsammlung scheint die Qualität der Lagerungsparameter nicht signifikant zu beeinflussen.

7. Abstract

Background: It is unclear whether maintaining the correct whole blood-to-anticoagulant (WB : AC) ratio during collection can improve the quality of red blood cell (RBC)-containing blood products to a clinically relevant degree.

Study design and methods: A total of 2 x 20 leukocyte-depleted whole blood (LD-WB) units suspended in CPDA-1 were investigated. In one group, the CPDA-1 anticoagulant was continuously added to the donated blood via a roller pump thereby preserving the correct WB to AC ratio during donation in order to prevent the so called citrate shock of RBCs, using a new drawing device (MacoPharma ABC®). In the other group, WB units were produced conventionally (Compomixer M2®). All WB units were leukocyte-depleted 2 hours post donation. ATP, 2,3-DPG, free Hb, K⁺, glucose, lactate, pH, RBC-deformability, RBC-aggregation and variables of coagulation (prothrombin time (PT), thrombin time (TT), activated partial thromboplastin time (aPTT), fibrinogen, factor-V-activity, factor-VIII-activity, antithrombin, D-dimer and thrombin-antithrombin complexes (TAT)) were determined on Days 1, 7, 21, 35, 42, and 49 of storage at 2-6° C. Variables of RBC deformability and aggregation were determined using a laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA™). Variables of coagulation were carried out on the Behring Coagulation System (BCS®XP).

Results: The ABC and the conventional group showed comparable unit volumes of 525 (SD 5,3) ml versus 524 (SD 10,2) ml and Hb content of 65,9 (SD 5,1) g/unit versus 67,5 (SD 7,8) g/unit, but higher variation after conventional blood drawing ($p = 0,006$ and $p = 0,07$, respectively) was observed. All 40 LD-WB units had less than 2×10^5 /unit residual leukocytes. During storage, none of the measured quality variables were significantly different between the groups, but in the conventional group there was a higher variation for fHb and K⁺ ($p = 0,04$), as well a tendency for a higher variation in the glucose-concentration ($p = 0,07$). Mean (SD) ATP was 2,33 (0,41) $\mu\text{mol/g}$ Hb versus 2,24 (0,39) $\mu\text{mol/g}$ Hb after 42-day storage. Deformability was not different ($p = 0,44$), whereas the extent of the aggregation was higher in the conventional group.

Conclusion: The ABC device provided a better standardized blood product but did not improve RBC storage variables or plasma quality of LD-WB. Excess anticoagulant CPDA-1 at the beginning of a donation appears not to significantly affect RBC storage in conventional blood drawing. It is unclear whether the lower degree of aggregation in the ABC-Group means to be of any advance for the recipients or may even has adverse effects.

8. Quellen

1. Standard issue transfusion versus fresher red cell use in intensive care: a randomized controlled trial (TRANSFUSE). Australian and New Zealand Intensive Care Research Center, 2012.
2. **Aarts PA, Heethaar RM, and Sixma JJ.** Red blood cell deformability influences platelets--vessel wall interaction in flowing blood. *Blood* 64: 1228-1233, 1984.
3. **Allen BW, and Piantadosi CA.** How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291: H1507-1512, 2006.
4. **Almac E, and Ince C.** The impact of storage on red cell function in blood transfusion. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 21: 195-208, 2007.
5. **Almizraq R, Tchir JD, Holovati JL, and Acker JP.** Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. *Transfusion* 53: 2258-2267, 2013.
6. **Alonso C, Pries AR, and Gaehtgens P.** Time-dependent rheological behavior of blood at low shear in narrow vertical tubes. *Am J Physiol* 265: H553-561, 1993.
7. **Alonso C, Pries AR, and Gaehtgens P.** Time-dependent rheological behaviour of blood flow at low shear in narrow horizontal tubes. *Biorheology* 26: 229-246, 1989.
8. **Ami RB, Barshtein G, Zeltser D, Goldberg Y, Shapira I, Roth A, Keren G, Miller H, Prochorov V, Eldor A, Berliner S, and Yedgar S.** Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 280: H1982-1988, 2001.
9. **An X, and Mohandas N.** Disorders of red cell membrane. *British journal of haematology* 141: 367-375, 2008.
10. **Anong WA, Franco T, Chu H, Weis TL, Devlin EE, Bodine DM, An X, Mohandas N, and Low PS.** Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. *Blood* 114: 1904-1912, 2009.
11. **Antonelou MH, Kriebardis AG, and Papassideri IS.** Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus* 8 Suppl 3: s39-47, 2010.
12. **Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, and Papassideri IS.** Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion* 50: 376-389, 2010.
13. **Arciero JC, Carlson BE, and Secomb TW.** Theoretical model of metabolic blood flow regulation: roles of ATP release by red blood cells and conducted responses. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 295: H1562-1571, 2008.
14. **Arese P, Turrini F, and Schwarzer E.** Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 16: 133-146, 2005.

15. **Armstrong JK, Meiselman HJ, and Fisher TC.** Covalent binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low shear blood viscosity. *Am J Hematol* 56: 26-28, 1997.
16. **Armstrong JK, Meiselman HJ, and Fisher TC.** Evidence against macromolecular "bridging" as the mechanism of red blood cell aggregation induced by nonionic polymers. *Biorheology* 36: 433-437, 1999.
17. **Armstrong JK, Meiselman HJ, Wenby RB, and Fisher TC.** Modulation of red blood cell aggregation and blood viscosity by the covalent attachment of Pluronic copolymers. *Biorheology* 38: 239-247, 2001.
18. **Atzil S, Arad M, Glasner A, Abiri N, Avraham R, Greenfeld K, Rosenne E, Beilin B, and Ben-Eliah S.** Blood transfusion promotes cancer progression: a critical role for aged erythrocytes. *Anesthesiology* 109: 989-997, 2008.
19. **Aubron C, Nichol A, Cooper DJ, and Bellomo R.** Age of red blood cells and transfusion in critically ill patients. *Ann Intensive Care* 3: 2, 2013.
20. **Baker RF.** Membrane deformability of metabolically depleted human red cells. *Blood Cells* 7: 551-560, 1981.
21. **Barshtein G, Wajnblum D, and Yedgar S.** Kinetics of linear rouleaux formation studied by visual monitoring of red cell dynamic organization. *Biophys J* 78: 2470-2474, 2000.
22. **Barthels M, and Poliwoda H.** *Gerinnungsanalysen*. Georg Thieme Verlag, 1998.
23. **Barthels M, Stangel W, Poiwoda H, and Trobisch H.** Untersuchungen zur Frage der Aktivierung des Gerinnungssystems in Blutkonserven. *Blut* 14: 1974.
24. **Baskurt OK.** Mechanisms of Blood Rheology Alterations. In: *Handbook of Hemorheology*. Amsterdam: IOS Press, 2007.
25. **Baskurt OK.** Pathophysiological Significance of Blood Rheology. *Turk J Med Sci* 33: 347 - 355, 2003.
26. **Baskurt OK, Gelmont D, and Meiselman HJ.** Red blood cell deformability in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 421-427, 1998.
27. **Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Shin S, Alexy T, and Meiselman HJ.** Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries. *Biorheology* 46: 251-264, 2009.
28. **Baskurt OK, and Mat F.** Importance of measurement temperature in detecting the alterations of red blood cell aggregation and deformability studied by ektacytometry: a study on experimental sepsis in rats. *Clinical hemorheology and microcirculation* 23: 43-49, 2000.
29. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** Activated polymorphonuclear leukocytes affect red blood cell aggregability. *Journal of leukocyte biology* 63: 89-93, 1998.
30. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 29: 435-450, 2003.

31. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** Cellular determinants of low-shear blood viscosity. *Biorheology* 34: 235-247, 1997.
32. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. *Clin Hemorheol Microcirc* 53: 23-37, 2013.
33. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** Hemodynamic effects of red blood cell aggregation. *Indian J Exp Biol* 45: 25-31, 2007.
34. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** In Vivo Hemorheology. In: *Handbook of Hemorheology*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, NL: IOS Press, 2007, p. 322 - 338.
35. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** RBC aggregation: more important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of in vivo blood flow in health and disease. *Microcirculation* 15: 585-590, 2008.
36. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** Red blood cell "aggregability". *Clin Hemorheol Microcirc* 43: 353-354, 2009.
37. **Baskurt OK, Meiselman HJ, and Kayar E.** Measurement of red blood cell aggregation in a "plate-plate" shearing system by analysis of light transmission. *Clin Hemorheol Microcirc* 19: 307-314, 1998.
38. **Baskurt OK, Temiz A, and Meiselman HJ.** Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med* 24: 102-110, 1998.
39. **Baskurt OK, Uyuklu M, and Meiselman HJ.** Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology* 41: 79-89, 2004.
40. **Baskurt OK, Yalcin O, Ozdem S, Armstrong JK, and Meiselman HJ.** Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 286: H222-229, 2004.
41. **Baumler H, Neu B, Donath E, and Kiesewetter H.** Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation. *Biorheology* 36: 439-442, 1999.
42. **Beckman-Coulter.** Glucose in Refrigerated Serum, Laboratory Procedure Manual. In: *Beckman Synchron LX20* Collaborative Laboratory Services, 2003 - 2004.
43. **Becton-Dickinson.** BD FACSCalibur Instructions For Use. In: *Optics Components and Theory of Operation*. San Jose, Ca, U.S.A.: Becton, Dickinson and Company, 2007, p. 18.
44. **Becton-Dickinson.** BD Leucocount™-Kit, Arbeitsanleitung. San Jose, CA, U.S.A.: Becton, Dickinson and Company, 2004.
45. **Benedum J.** Geschichte der Bluttransfusion. In: *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, edited by Kiefel V. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010, p. 4 - 13.
46. **Benedum J.** [History of the development of blood transfusion]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 36 Suppl 2: S83-86, 2001.

47. **Benesch R, and Benesch RE.** The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 26: 162-167, 1967.
48. **Benesch R, Benesch RE, and Yu CI.** Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59: 526-532, 1968.
49. **Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, Telen MJ, Ortel TL, Reid TS, Mulherin MA, Zhu H, Buck RD, Califf RM, and McMahon TJ.** Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 17063-17068, 2007.
50. **Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, and Machiedo GW.** Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res* 102: 6-12, 2002.
51. **Bessis M, Mohandas N, and Feo C.** Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices. *Blood Cells* 6: 315-327, 1980.
52. **Betke K, and Savelsberg W.** [Stage-photometric determination of hemoglobin by means of cyanhemoglobin]. *Klinische Wochenschrift* 28: 482, 1950.
53. **Betz T, Lenz M, Joanny JF, and Sykes C.** ATP-dependent mechanics of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15320-15325, 2009.
54. **Beutler E.** Energy Metabolism and Maintenance of Erythrocytes. In: *Williams Hematology*, McGraw-Hill Publishing Co., 2001.
55. **Beutler E, and Wood L.** The in vivo regeneration of red cell 2,3 diphosphoglyceric acid (DPG) after transfusion of stored blood. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 74: 300-304, 1969.
56. **Bhaduri B, Kandel M, Brugnara C, Tangella K, and Popescu G.** Optical assay of erythrocyte function in banked blood. *Sci Rep* 4: 6211, 2014.
57. **Bigey F, Isola H, Wiesel ML, and Cazenave JP.** Whole blood collection with continuous proportional anticoagulation using the MacoPharma ABC® Automate. *French Blood Institute* 2005.
58. **Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H222-236, 2001.
59. **Bishop JJ, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Effects of erythrocyte aggregation and venous network geometry on red blood cell axial migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H939-950, 2001.
60. **Bishop JJ, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Rheological effects of red blood cell aggregation in the venous network: a review of recent studies. *Biorheology* 38: 263-274, 2001.

61. **Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 284: H1577-1584, 2003.
62. **Bosman GJ.** Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences. *Front Physiol* 4: 376, 2013.
63. **Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotny VM, Bos H, and De Grip WJ.** The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 48: 827-835, 2008.
64. **Bosman GJ, Stappers M, and Novotny VM.** Changes in band 3 structure as determinants of erythrocyte integrity during storage and survival after transfusion. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 8 Suppl 3: s48-52, 2010.
65. **Bosman GJ, Werre JM, Willekens FL, and Novotny VM.** Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfusion medicine* 18: 335-347, 2008.
66. **Bouchard D, Marcheix B, Al-Shamary S, Vanden Eynden F, Demers P, Robitaille D, Pellerin M, Perrault LP, and Carrier M.** Preoperative autologous blood donation reduces the need for allogeneic blood products: a prospective randomized study. *Can J Surg* 51: 422-427, 2008.
67. **Brandao MM, Castro Mde L, Fontes A, Cesar CL, Costa FF, and Saad ST.** Impaired red cell deformability in iron deficient subjects. *Clinical hemorheology and microcirculation* 43: 217-221, 2009.
68. **Bruil A, Beugeling T, Feijen J, and van Aken WG.** The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfusion medicine reviews* 9: 145-166, 1995.
69. **Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Piscitelli V, Pickard C, Napychank P, and Edberg S.** Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion* 34: 852-857, 1994.
70. **Bundesanzeiger.** Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) Bundesministerium der Justiz, 2005.
71. **Bundesärztekammer.** Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) - 2 Richtlinienfassung. 2010.
72. **Cabrales P.** Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 293: H1206-1215, 2007.
73. **Campanella ME, Chu H, and Low PS.** Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 2402-2407, 2005.
74. **Card RT.** Red cell membrane changes during storage. *Transfus Med Rev* 2: 40-47, 1988.

75. **Card RT, Mohandas N, and Mollison PL.** Relationship of post-transfusion viability to deformability of stored red cells. *British journal of haematology* 53: 237-240, 1983.
76. **Carlson BE, Arciero JC, and Secomb TW.** Theoretical model of blood flow autoregulation: roles of myogenic, shear-dependent, and metabolic responses. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 295: H1572-1579, 2008.
77. **Chabanel A, Reinhart W, and Chien S.** Increased resistance to membrane deformation of shape-transformed human red blood cells. *Blood* 69: 739-743, 1987.
78. **Charansonney O, Mouren S, Dufaux J, Duvelleroy M, and Vicaud E.** Red blood cell aggregation and blood viscosity in an isolated heart preparation. *Biorheology* 30: 75-84, 1993.
79. **Chasan B, Geisse NA, Pedatella K, Wooster DG, Teintze M, Carattino MD, Goldmann WH, and Cantiello HF.** Evidence for direct interaction between actin and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *European biophysics journal : EBJ* 30: 617-624, 2002.
80. **Chasis JA, and Mohandas N.** Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *The Journal of cell biology* 103: 343-350, 1986.
81. **Chien S.** Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol* 49: 177-192, 1987.
82. **Chien S, Usami S, Dellenback RJ, and Gregersen MI.** Shear-dependent deformation of erythrocytes in rheology of human blood. *Am J Physiol* 219: 136-142, 1970.
83. **Chin-Yee I, Arya N, and d'Almeida MS.** The red cell storage lesion and its implication for transfusion. *Transfusion science* 18: 447-458, 1997.
84. **Cluitmans JC, Hardeman MR, Dinkla S, Brock R, and Bosman GJ.** Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in the Blood Bank. *Blood Transfus* 10 Suppl 2: s12-18, 2012.
85. **Cober N, Lacasse M, Bart B, and Rock G.** Effects of different concentrations of anticoagulant on the in vitro characteristics of autologous whole blood. *Transfusion* 41: 1606-1609, 2001.
86. **Cokelet GR, and Goldsmith HL.** Decreased hydrodynamic resistance in the two-phase flow of blood through small vertical tubes at low flow rates. *Circ Res* 68: 1-17, 1991.
87. **Cokelet GR, and Meiselman HJ.** Macro- and micro-rheological properties of blood. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, NL: IOS Press, 2007, p. 45-71.
88. **Cooke BM, and Lim CT.** Mechanical and Adhesive Properties of Healthy and Diseased Red Blood Cells. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, NL: IOS Press, 2007, p. 91-113.

89. **D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, Antonelou MH, Hansen KC, Papassideri IS, and Zolla L.** An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion* 55: 205-219, 2015.
90. **D'Alessandro A, Liumbruno G, Grazzini G, and Zolla L.** Red blood cell storage: the story so far. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 8: 82-88, 2010.
91. **D'Amici GM, Rinalducci S, and Zolla L.** Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res* 6: 3242-3255, 2007.
92. **Dade-Behring.** BC-Thrombin-Reagenz, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2003.
93. **Dade-Behring.** BCS[®] System Bedienungsanleitung Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2003.
94. **Dade-Behring.** Berichrom[®] Antithrombin III (A), Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2005.
95. **Dade-Behring.** D-Dimer PLUS, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2005.
96. **Dade-Behring.** Enzygnost[®] TAT micro, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2005.
97. **Dade-Behring.** Faktor VIII Chromogen, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2004.
98. **Dade-Behring.** Gerinnungsfaktor V-Mangelplasma, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2003.
99. **Dade-Behring.** Pathrombin[®] SL, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2003.
100. **Dade-Behring.** Thromborel[®] S, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Dade Behring Marburg GmbH, 2002.
101. **Daleke DL.** Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 15: 191-195, 2008.
102. **Danesh A, Inglis HC, Jackman RP, Wu S, Deng X, Muench MO, Heitman JW, and Norris PJ.** Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood* 123: 687-696, 2014.
103. **de Oliveira S, Silva-Herdade AS, and Saldanha C.** Modulation of erythrocyte deformability by PKC activity. *Clin Hemorheol Microcirc* 39: 363-373, 2008.
104. **Dengler J, and Dreger P.** Bildung, Aufbau, Funktion und Kinetik hämatopoetischer Zellen In: *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* edited by Kiefel V, and Mueller-Eckhardt C. Heidelberg: Springer, 2010, p. 17 - 34.
105. **Deplaine G, Safeukui I, Jeddi F, Lacoste F, Brousse V, Perrot S, Biligui S, Guillotte M, Guitton C, Dokmak S, Aussilhou B, Sauvanet A, Cazals Hatem D,**

Paye F, Thellier M, Mazier D, Milon G, Mohandas N, Mercereau-Puijalon O, David PH, and Buffet PA. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood* 117: e88-95, 2011.

106. **Dern RJ, Brewer GJ, and Wiorkowski JJ.** Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 69: 968-978, 1967.

107. **Dietl P, and Gassmann M.** Atmung. In: *Physiologie*, edited by Speckmann EJ, Hescheler J, and Köhling R. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer, 2013, p. 453.

108. **Dobbe JGG.** *LORCA, Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer, User's Manual*. Amsterdam, The Netherlands: Academic Medical Center (AMC), University of Amsterdam, 2004.

109. **Doctor A, and Spinella P.** Effect of processing and storage on red blood cell function in vivo. *Semin Perinatol* 36: 248-259, 2012.

110. **Donati A, Damiani E, Luchetti M, Domizi R, Scorcella C, Carsetti A, Gabbanelli V, Carletti P, Bencivenga R, Vink H, Adrario E, Piagnerelli M, Gabrielli A, Pelaia P, and Ince C.** Microcirculatory effects of the transfusion of leukodepleted or non-leukodepleted red blood cells in patients with sepsis: a pilot study. *Critical care* 18: R33, 2014.

111. **Dörner K.** Blutgase - Säure-Basen-Haushalt. In: *Klinische Chemie und Hämatologie*, edited by Dörner K. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003, p. 187 - 196.

112. **Dörner K.** Plasmatische Gerinnung. In: *Klinische Chemie und Hämatologie*, edited by Dörner K. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003, p. 291-300.

113. **Durussel JJ, Berthault MF, Guiffant G, and Dufaux J.** Effects of red blood cell hyperaggregation on the rat microcirculation blood flow. *Acta Physiol Scand* 163: 25-32, 1998.

114. **Dyrda A, Cytlak U, Ciuraszkiewicz A, Lipinska A, Cueff A, Bouyer G, Egee S, Bennekou P, Lew VL, and Thomas SL.** Local membrane deformations activate Ca²⁺-dependent K⁺ and anionic currents in intact human red blood cells. *PLoS One* 5: e9447, 2010.

115. **Dzik WS, Kyeyune D, Otekat G, Natukunda B, Hume H, Kasirye PG, Ddungu H, Kajja I, Dhabangi A, Mugenyi GR, Seguin C, Barnes L, and Delaney M.** Transfusion Medicine in Sub-Saharan Africa: Conference Summary. *Transfusion medicine reviews* 29: 195-204, 2015.

116. **Elfath MD.** Is it time to focus on preserving the functionality of red blood cells during storage? *Transfusion* 46: 1469-1470, 2006.

117. **Ellsworth ML, Ellis CG, Goldman D, Stephenson AH, Dietrich HH, and Sprague RS.** Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 24: 107-116, 2009.

118. **Eppendorf-AG**. Informationen zu den Lösungen für die Flammenphotometrie. Hamburg, Germany: Eppendorf AG, 2003.
119. **Ericson A, and de Verdier CH**. A modified method for the determination of 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 29: 84-90, 1972.
120. **European-Committee-on-Blood-Transfusion**. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*. Strasbourg: Council of Europe, 2013.
121. **Evans E, Mohandas N, and Leung A**. Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes. Major influence of cell hemoglobin concentration. *The Journal of clinical investigation* 73: 477-488, 1984.
122. **Evans J, Gratzer W, Mohandas N, Parker K, and Sleep J**. Fluctuations of the red blood cell membrane: relation to mechanical properties and lack of ATP dependence. *Biophysical journal* 94: 4134-4144, 2008.
123. **Fahraeus R**. The influence of the rouleau formation of the erythrocytes on the rheology of the blood. *Acta medica Scandinavica* 161: 151-165, 1958.
124. **Farges E, Grebe R, and Baumann M**. Viscoelastic and biochemical properties of erythrocytes during storage with SAG-M at +4 degrees C. *Clinical hemorheology and microcirculation* 27: 1-11, 2002.
125. **Feo C, and Mohandas N**. Clarification of role of ATP in red-cell morphology and function. *Nature* 265: 166-168, 1977.
126. **Feo CJ, and Leblond PF**. The discocyte-echinocyte transformation: comparison of normal and ATP-enriched human erythrocytes. *Blood* 44: 639-647, 1974.
127. **Fergusson D, Hutton B, Hogan DL, LeBel L, Blajchman MA, Ford JC, Hebert P, Kakadekar A, Kovacs L, Lee S, Sankaran K, Shapiro S, Smyth JA, Ramesh K, Bouali NR, Tinmouth A, and Walker R**. The age of red blood cells in premature infants (ARIPI) randomized controlled trial: study design. *Transfusion medicine reviews* 23: 55-61, 2009.
128. **Fergusson DA, Hebert P, Hogan DL, LeBel L, Rouvinez-Bouali N, Smyth JA, Sankaran K, Tinmouth A, Blajchman MA, Kovacs L, Lachance C, Lee S, Walker CR, Hutton B, Ducharme R, Balchin K, Ramsay T, Ford JC, Kakadekar A, Ramesh K, and Shapiro S**. Effect of fresh red blood cell transfusions on clinical outcomes in premature, very low-birth-weight infants: the ARIPI randomized trial. *JAMA* 308: 1443-1451, 2012.
129. **Ferrell JE, Jr., and Huestis WH**. Phosphoinositide metabolism and the morphology of human erythrocytes. *The Journal of cell biology* 98: 1992-1998, 1984.
130. **Ferru E, Giger K, Pantaleo A, Campanella E, Grey J, Ritchie K, Vono R, Turrini F, and Low PS**. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood* 117: 5998-6006, 2011.
131. **Fischer TM**. Shape memory of human red blood cells. *Biophysical journal* 86: 3304-3313, 2004.

132. **Fisher AB, Chien S, Barakat AI, and Nerem RM.** Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L529-533, 2001.
133. **Fontana S, Weingand T, Maier A, and Taleghani BM.** Prospective, Paired Crossover Comparison of the in vitro Quality of Red Blood Cells Collected by the Automate for Blood Collection Device or by a Conventional Method. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 36: 289-292, 2009.
134. **Forsyth AM, Wan J, Owrutsky PD, Abkarian M, and Stone HA.** Multiscale approach to link red blood cell dynamics, shear viscosity, and ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 10986-10991, 2011.
135. **Franco RS.** The measurement and importance of red cell survival. *American journal of hematology* 84: 109-114, 2009.
136. **Frank SM, Abazyan B, Ono M, Hogue CW, Cohen DB, Berkowitz DE, Ness PM, and Barodka VM.** Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. *Anesthesia and analgesia* 116: 975-981, 2013.
137. **Frenette PS, and Mohandas N.** Bad blood: a trigger for TRALI. *Nat Med* 16: 382-383, 2010.
138. **Friedlander MH, Simon R, and Machiedo GW.** The relationship of packed cell transfusion to red blood cell deformability in systemic inflammatory response syndrome patients. *Shock* 9: 84-88, 1998.
139. **Friesen RH, Perryman KM, Weigers KR, Mitchell MB, and Friesen RM.** A trial of fresh autologous whole blood to treat dilutional coagulopathy following cardiopulmonary bypass in infants. *Paediatr Anaesth* 16: 429-435, 2006.
140. **Gaetgens P, Duhrrsen C, and Albrecht KH.** Motion, deformation, and interaction of blood cells and plasma during flow through narrow capillary tubes. *Blood Cells* 6: 799-817, 1980.
141. **Gao Y, Lv L, Liu S, Ma G, and Su Y.** Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells. *Vox sanguinis* 105: 11-17, 2013.
142. **Gibson JG, 2nd, Murphy WP, Jr., Rees SB, and Scheitlin WA.** The influence of extracellular factors involved in the collection of blood in ACD on maintenance of red cell viability during refrigerated storage. *Am J Clin Pathol* 26: 855-873, 1956.
143. **Gibson JG, 2nd, Rees SB, Mc MT, and Scheitlin WA.** A citrate-phosphatedextrose solution for the preservation of human blood. *Am J Clin Pathol* 28: 569-578, 1957.
144. **Glodek AM, Mirchev R, Golan DE, Khoory JA, Burns JM, Shevkoplyas SS, Nicholson-Weller A, and Ghiran IC.** Ligation of complement receptor 1 increases erythrocyte membrane deformability. *Blood* 116: 6063-6071, 2010.
145. **Godin C, and Caprani A.** Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity. *Eur Biophys J* 26: 175-182, 1997.

146. **Gov N.** Less is more: removing membrane attachments stiffens the RBC cytoskeleton. *New Journal of Physics* 9: 2007.
147. **Greenwalt TJ.** The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion* 46: 143-152, 2006.
148. **Greenwalt TJ, Steane EA, Lau FO, and Sweeney-Hammond K.** Aging of the human erythrocyte. *Progress in clinical and biological research* 43: 195-212, 1980.
149. **Greenwalt TJ, Zehner Sostok C, and Dumaswala UJ.** Studies in red blood cell preservation. 2. Comparison of vesicle formation, morphology, and membrane lipids during storage in AS-1 and CPDA-1. *Vox Sang* 58: 90-93, 1990.
150. **Haradin AR, Weed RI, and Reed CF.** Changes in physical properties of stored erythrocytes relationship to survival in vivo. *Transfusion* 9: 229-237, 1969.
151. **Hardeman MR, Dobbe JG, and Ince C.** The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clinical hemorheology and microcirculation* 25: 1-11, 2001.
152. **Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, and Lettinga KP.** Laser-assisted optical rotational cell analyser (L.O.R.C.A.); I. A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clinical Hemorheology* 14: 605 - 618, 1994.
153. **Hardeman MR, Goedhart PT, and Shin S.** Methods in Hemorheology. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, edited by Baskurt OK, and Meiselman HJ. Amsterdam: IOS Press, 2007, p. 242 - 266.
154. **Hardeman MR, and Ince C.** Clinical potential of in vitro measured red cell deformability, a myth? *Clinical hemorheology and microcirculation* 21: 277-284, 1999.
155. **Heaton A, Keegan T, and Holme S.** In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells. *Br J Haematol* 71: 131-136, 1989.
156. **Heaton WA, Holme S, Smith K, Brecher ME, Pineda A, AuBuchon JP, and Nelson E.** Effects of 3-5 log₁₀ pre-storage leucocyte depletion on red cell storage and metabolism. *British journal of haematology* 87: 363-368, 1994.
157. **Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, Tweeddale M, Schweitzer I, and Yetisir E.** A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion Requirements in Critical Care Investigators, Canadian Critical Care Trials Group. *The New England Journal of Medicine* 340: 409-417, 1999.
158. **Heddle NM, Klama LN, Griffith L, Roberts R, Shukla G, and Kelton JG.** A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion* 33: 794-797, 1993.
159. **Heiden M, Salge U, Henschler R, Pfeiffer HU, Volkers P, Hesse J, Sireis W, and Seitz R.** Plasma quality after whole-blood filtration depends on storage temperature and filter type. *Transfus Med* 14: 297-304, 2004.

160. **Heim MU.** [Blood, blood components and plasma derivatives. Guideline-based implementation]. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 106: 183-188, 2011.
161. **Henkelman S, Dijkstra-Tiekstra MJ, de Wildt-Eggen J, Graaff R, Rakhorst G, and van Oeveren W.** Is red blood cell rheology preserved during routine blood bank storage? *Transfusion* 50: 941-948, 2010.
162. **Herold G.** *Innere Medizin 2011*. Köln: Gerd Herold, 2011.
163. **Hess B, and Brand K.** Cell and Tissue Disintegration - General. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmeyer HU, Bergmeyer J, and Graßl M. Weinheim, Deutschland: VCH Verlagsgesellschaft, 1988, p. 26 - 30.
164. **Hess B, and Brand K.** Cell and Tissue Disintegration, General. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by U. BH, Bergmeyer J, and Graßl M. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1989, p. 26-30.
165. **Hess JR.** Conventional blood banking and blood component storage regulation: opportunities for improvement. *Blood Transfus* 8 Suppl 3: s9-15, 2010.
166. **Hess JR.** Red cell storage: when is better not good enough? *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 7: 172-173, 2009.
167. **Hess JR, and Greenwalt TG.** Storage of red blood cells: new approaches. *Transfus Med Rev* 16: 283-295, 2002.
168. **Hess JR, Sparrow RL, van der Meer PF, Acker JP, Cardigan RA, and Devine DV.** Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion* 49: 2599-2603, 2009.
169. **Hoffbrand AV, Lewis SM, and Tuddenham EGD.** Inherited haemolytic anaemias. In: *Postgraduate Haematology*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999, p. 120-143.
170. **Hogman CF, de Verdier CH, and Borgstrom L.** Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4 degrees C. II. Relation between cellular morphology and viability. *Vox Sang* 52: 20-23, 1987.
171. **Hogman CF, de Verdier CH, Ericson A, Hedlund K, and Sandhagen B.** Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4 degrees C in vitro. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. *Vox Sang* 48: 257-268, 1985.
172. **Hogman CF, and Meryman HT.** Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited. *Transfusion* 46: 137-142, 2006.
173. **Hogman CF, and Meryman HT.** Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. *Transfusion medicine reviews* 13: 275-296, 1999.
174. **Hou HW, Bhagat AA, Chong AG, Mao P, Tan KS, Han J, and Lim CT.** Deformability based cell margination--a simple microfluidic design for malaria-infected erythrocyte separation. *Lab Chip* 10: 2605-2613, 2010.

175. **Hovav T, Yedgar S, Manny N, and Barshtein G.** Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage. *Transfusion* 39: 277-281, 1999.
176. **Hsia CC.** Respiratory function of hemoglobin. *The New England Journal of Medicine* 338: 239-247, 1998.
177. **Hughes C, Thomas KB, Schiff P, Herrington RW, Polacsek EE, and McGrath KM.** Effect of delayed blood processing on the yield of factor VIII in cryoprecipitate and factor VIII concentrate. *Transfusion* 28: 566-570, 1988.
178. **Huruta RR, Barjas-Castro ML, Saad ST, Costa FF, Fontes A, Barbosa LC, and Cesar CL.** Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers. *Blood* 92: 2975-2977, 1998.
179. **Isbister JP.** Hyperviscosity: Clinical Disorders. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, NL: IOS Press, 2007, p. 371 - 391.
180. **Izzo P, Manicone A, Spagnuolo A, Laut VM, Di Pasquale A, and Di Monte D.** Erythrocytes stored in CPD SAG-mannitol: evaluation of their deformability. *Clinical hemorheology and microcirculation* 21: 335-339, 1999.
181. **Jan KM, and Chien S.** Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J Gen Physiol* 61: 638-654, 1973.
182. **Jeanne M, Piquet Y, Ivanovic Z, Vezon G, and Salmi LR.** Variations of factor VIII:C plasma levels with respect to the blood group ABO. *Transfusion medicine* 14: 187-188, 2004.
183. **Jensen FB.** The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow. *J Exp Biol* 212: 3387-3393, 2009.
184. **Jiwaji Z, Nunn KP, Conway-Morris A, Simpson AJ, Wyncoll D, Rossi AG, and Walsh TS.** Leukoreduced blood transfusion does not increase circulating soluble markers of inflammation: a randomized controlled trial. *Transfusion* 54: 2404-2411, 2014.
185. **Johnson CP, Tang HY, Carag C, Speicher DW, and Discher DE.** Forced unfolding of proteins within cells. *Science* 317: 663-666, 2007.
186. **Johnson PC, Bishop JJ, Popel S, and Intaglietta M.** Effects of red cell aggregation on the venous microcirculation. *Biorheology* 36: 457-460, 1999.
187. **Johnson RM.** pH effects on red cell deformability. *Blood Cells* 11: 317-321, 323-314, 1985.
188. **Ju M, Ye SS, Low HT, Zhang J, Cabrales P, Leo HL, and Kim S.** Effect of deformability difference between two erythrocytes on their aggregation. *Phys Biol* 10: 036001, 2013.
189. **Karger R, Lukow C, and Kretschmer V.** Deformability of Red Blood Cells and Correlation with ATP Content during Storage as Leukocyte-Depleted Whole Blood. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 39: 277-282, 2012.

190. **Karon BS, Hoyer JD, Stubbs JR, and Thomas DD.** Changes in Band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells. *Transfusion* 49: 1435-1442, 2009.
191. **Karon BS, van Buskirk CM, Jaben EA, Hoyer JD, and Thomas DD.** Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 10: 453-461, 2012.
192. **Kay M.** Immunoregulation of cellular life span. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1057: 85-111, 2005.
193. **Keller ME, Jean R, LaMorte WW, Millham F, and Hirsch E.** Effects of age of transfused blood on length of stay in trauma patients: a preliminary report. *The Journal of trauma* 53: 1023-1025, 2002.
194. **Kim S, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H584-590, 2005.
195. **Kim S, Popel AS, Intaglietta M, and Johnson PC.** Effect of erythrocyte aggregation at normal human levels on functional capillary density in rat spinotrapezius muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H941-947, 2006.
196. **Kiraly LN, Underwood S, Differding JA, and Schreiber MA.** Transfusion of aged packed red blood cells results in decreased tissue oxygenation in critically injured trauma patients. *The Journal of trauma* 67: 29-32, 2009.
197. **Kirby BS, Hanna G, Hendargo HC, and McMahon TJ.** Restoration of intracellular ATP production in banked red blood cells improves inducible ATP export and suppresses RBC-endothelial adhesion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 307: H1737-1744, 2014.
198. **Kirchner H, Kruse A, Neustock P, and Rink L.** *Cytokine und Interferone*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1994.
199. **Klein HG.** *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. Blackwell Publishing, 2005.
200. **Klein HG, and Anstee DJ.** *Mollison's blood transfusion in clinical medicine*. Blackwell Publishing Ltd, 2005.
201. **Klinikum der Philipps-Universität Marburg IfTuH.** Bestimmung von freiem Hämoglobin (Verfahrensanweisung). Klinikum der Philipps-Universität Marburg, 2005.
202. **Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, and Blackstone EH.** Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *The New England Journal of Medicine* 358: 1229-1239, 2008.
203. **Kretschmer V, and Weippert-Kretschmer M.** Notfall und Massivtransfusion. In: *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, edited by Kiefel V. Heidelberg/Berlin: Springer-Verlag, 2010, p. 406 - 418.
204. **Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, and Papassideri IS.** Storage-dependent remodeling of the red blood cell

membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion* 47: 1212-1220, 2007.

205. **Kuruvillea DJ, Nalbant D, Widness JA, and Veng-Pedersen P.** Mean remaining life span: a new clinically relevant parameter to assess the quality of transfused red blood cells. *Transfusion* 54: 2724-2729, 2014.

206. **La Celle PL.** Alteration of deformability of the erythrocyte membrane in stored blood. *Transfusion* 9: 238-245, 1969.

207. **Lacroix J, Hebert P, Fergusson D, Tinmouth A, Blajchman MA, Callum J, Cook D, Marshall JC, McIntyre L, and Turgeon AF.** The Age of Blood Evaluation (ABLE) randomized controlled trial: study design. *Transfusion medicine reviews* 25: 197-205, 2011.

208. **Lacroix J, Hebert PC, Fergusson DA, Tinmouth A, Cook DJ, Marshall JC, Clayton L, McIntyre L, Callum J, Turgeon AF, Blajchman MA, Walsh TS, Stanworth SJ, Campbell H, Capellier G, Tiberghien P, Bardiaux L, van de Watering L, van der Meer NJ, Sabri E, and Vo D.** Age of transfused blood in critically ill adults. *The New England Journal of Medicine* 372: 1410-1418, 2015.

209. **Laine E, Steadman R, Calhoun L, Blackall D, Levin P, Braunfeld M, Nourmand H, Neelakanta G, Ting L, Gornbein J, Busuttil R, and Petz L.** Comparison of RBCs and FFP with whole blood during liver transplant surgery. *Transfusion* 43: 322-327, 2003.

210. **Lamprecht W, and Trautschold I.** ATP, Bestimmung mit Hexokinase und Glukose-g-phosphat-Dehydrogenase. In: *Methoden der Enzymatischen Analyse* edited by Bergmeyer HU. Weinheim: Verlag Chemie, 1974, p. 2151-2160.

211. **Lancaster JR, Jr.** Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8137-8141, 1994.

212. **Landsteiner K, and Wiener AS.** STUDIES ON AN AGGLUTINOGEN (Rh) IN HUMAN BLOOD REACTING WITH ANTI-RHESUS SERA AND WITH HUMAN ISOANTIBODIES. *The Journal of experimental medicine* 74: 309-320, 1941.

213. **Lang KS, Lang PA, Bauer C, Durantion C, Wieder T, Huber SM, and Lang F.** Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15: 195-202, 2005.

214. **Lee JS, and Gladwin MT.** Bad blood: the risks of red cell storage. *Nat Med* 16: 381-382, 2010.

215. **Lelubre C, Piagnerelli M, and Vincent JL.** Association between duration of storage of transfused red blood cells and morbidity and mortality in adult patients: myth or reality? *Transfusion* 49: 1384-1394, 2009.

216. **Levin S, and Korenstein R.** Membrane fluctuations in erythrocytes are linked to MgATP-dependent dynamic assembly of the membrane skeleton. *Biophysical journal* 60: 733-737, 1991.

217. **Lew VL, Daw N, Etzion Z, Tiffert T, Muoma A, Vanagas L, and Bookchin RM.** Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells. *Blood* 110: 1334-1342, 2007.
218. **Li Q, Jungmann V, Kiyatkin A, and Low PS.** Prostaglandin E2 stimulates a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability. *The Journal of biological chemistry* 271: 18651-18656, 1996.
219. **Lim HWG, Wortis M, and Mukhopadhyay R.** Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 16766-16769, 2002.
220. **Ling E, Danilov YN, and Cohen CM.** Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation. *J Biol Chem* 263: 2209-2216, 1988.
221. **Linko K, and Saxelin I.** Electrolyte and acid-base disturbances caused by blood transfusions. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 30: 139-144, 1986.
222. **Lip GY.** Fibrinogen and cardiovascular disorders. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 88: 155-165, 1995.
223. **Lipowsky HH.** Blood Rheology Aspects of the Microcirculation. In: *Handbook of Hemorheology*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam: IOS Press, 2007, p. 307 - 321.
224. **Liu C, Zhao W, Christ GJ, Gladwin MT, and Kim-Shapiro DB.** Nitric oxide scavenging by red cell microparticles. *Free radical biology & medicine* 65: 1164-1173, 2013.
225. **Löffler G.** *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Berlin: Springer, 2001.
226. **Löffler G, Petrides PE, and Heinrich PC.** *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer, 2007.
227. **Lohman AW, Billaud M, and Isakson BE.** Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovascular research* 95: 269-280, 2012.
228. **Loutit JF, and Mollison PL.** Disodium-Citrate-Glucose Mixture as a Blood Preservative. *Br Med J (Clin Res Ed)* 2: 744-745, 1943.
229. **Luk CS, Gray-Statchuk LA, Cepinkas G, and Chin-Yee IH.** WBC reduction reduces storage-associated RBC adhesion to human vascular endothelial cells under conditions of continuous flow in vitro. *Transfusion* 43: 151-156, 2003.
230. **Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Schaap NP, de Grip WJ, Bos HJ, and Bosman GJ.** Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion* 48: 1478-1485, 2008.
231. **MacLennan S, and Murphy MF.** Survey of the use of whole blood in current blood transfusion practice. *Clinical and laboratory haematology* 23: 391-396, 2001.

232. **Mangalmurti NS, Xiong Z, Hulver M, Ranganathan M, Liu XH, Oriss T, Fitzpatrick M, Rubin M, Triulzi D, Choi A, and Lee JS.** Loss of red cell chemokine scavenging promotes transfusion-related lung inflammation. *Blood* 113: 1158-1166, 2009.
233. **Manno S, Mohandas N, and Takakuwa Y.** ATP-dependent mechanism protects spectrin against glycation in human erythrocytes. *The Journal of biological chemistry* 285: 33923-33929, 2010.
234. **Manno S, Takakuwa Y, and Mohandas N.** Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1943-1948, 2002.
235. **Manno S, Takakuwa Y, and Mohandas N.** Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem* 280: 7581-7587, 2005.
236. **Manno S, Takakuwa Y, Nagao K, and Mohandas N.** Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 270: 5659-5665, 1995.
237. **Mansouri Taleghani B, Grossmann R, Waltenberger G, Geise W, Langer R, Henrich HA, and Wiebecke D.** [Storage-induced rheologic and biochemical changes in erythrocyte concentrates with added solution and possible correlations]. *Beiträge zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin = Contributions to infusion therapy and transfusion medicine* 33: 141-144, 1996.
238. **Marik PE, and Sibbald WJ.** Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis. *JAMA* 269: 3024-3029, 1993.
239. **Marton Z, Kesmarky G, Vekasi J, Cser A, Russai R, Horvath B, and Toth K.** Red blood cell aggregation measurements in whole blood and in fibrinogen solutions by different methods. *Clinical hemorheology and microcirculation* 24: 75-83, 2001.
240. **Matthes G, Tofote U, Krause KP, Pawlow I, Kucera W, and Lerche D.** Improved red cell quality after erythroplasmapheresis with MCS-3P. *J Clin Apher* 9: 183-188, 1994.
241. **Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, and Royston P.** Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* 300: 230-235, 1990.
242. **Mayer K, Dwyer A, and Laughlin JS.** Spleen scanning using ACD-damaged red cells tagged with 51Cr. *J Nucl Med* 11: 455-458, 1970.
243. **Mayer K, Ley AB, and D'Amaro J.** Impairment of red cell viability by exposure to "excess" acid-citrate dextrose. *Blood* 28: 513-523, 1966.
244. **McHedlishvili G, Gobejishvili L, and Beritashvili N.** Effect of intensified red blood cell aggregability on arterial pressure and mesenteric microcirculation. *Microvascular research* 45: 233-242, 1993.
245. **McHedlishvili G, Gobejishvili L, Mamaladze A, Momtselidze N, and Varazashvili M.** Microcirculatory stasis induced by hemorheological disorders: further evidence. *Microcirculation* 6: 97-106, 1999.

246. **Meiselman HJ.** Red blood cell aggregation: 45 years being curious. *Biorheology* 46: 1-19, 2009.
247. **Meiselman HJ.** Rheology of shape-transformed human red cells. *Biorheology* 15: 225-237, 1978.
248. **Meyerstein N, Mazor D, and Dvilansky A.** Changes in agglomeration of human red blood cells in liquid storage in CPD media. *Transfusion* 17: 115-122, 1977.
249. **Meyerstein N, Mazor D, and Dvilansky A.** Erythrocyte agglomeration and survival studies in citrate-phosphate-dextrose (CPD) units. *Blut* 39: 211-216, 1979.
250. **Michal G.** D-Glycerat-2,3-diphosphat. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, edited by Bergmeyer HU, and Gawehn K. Weinheim: Verlag Chemie, 1974.
251. **Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, and Shohet SB.** Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *The Journal of clinical investigation* 66: 563-573, 1980.
252. **Mohandas N, and Evans E.** Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 787-818, 1994.
253. **Mohandas N, and Gallagher PG.** Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112: 3939-3948, 2008.
254. **Moroff G, Sohmer PR, and Button LN.** Proposed standardization of methods for determining the 24-hour survival of stored red cells. *Transfusion* 24: 109-114, 1984.
255. **Mueller-Eckhardt C, and Kiefel V.** *Transfusionsmedizin*. Springer, 2003.
256. **Mueller-Eckhardt C, and Kiefel V.** *Transfusionsmedizin*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2004.
257. **Murdock AD, Berseus O, Hervig T, Strandenes G, and Lunde TH.** Whole blood: the future of traumatic hemorrhagic shock resuscitation. *Shock* 41 Suppl 1: 62-69, 2014.
258. **Nakao M, Nakao T, and Yamazoe S.** Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. *Nature* 187: 945-946, 1960.
259. **Nakashima K, and Beutler E.** Effect of anti-spectrin antibody and ATP on deformability of resealed erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 3823-3825, 1978.
260. **Namgung B, Ong PK, Johnson PC, and Kim S.** Effect of cell-free layer variation on arteriolar wall shear stress. *Ann Biomed Eng* 39: 359-366, 2011.
261. **Nash TW, Libby DM, and Horwitz MA.** Interaction between the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) and human alveolar macrophages. Influence of antibody, lymphokines, and hydrocortisone. *The Journal of clinical investigation* 74: 771-782, 1984.

262. **Natukunda B, Schonewille H, and Smit Sibinga CT.** Assessment of the clinical transfusion practice at a regional referral hospital in Uganda. *Transfusion medicine* 20: 134-139, 2010.
263. **Neu B, Armstrong JK, Fisher TC, and Meiselman HJ.** Aggregation of human RBC in binary dextran-PEG polymer mixtures. *Biorheology* 38: 53-68, 2001.
264. **Neu B, and Meiselman HJ.** Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophysical journal* 83: 2482-2490, 2002.
265. **Neu B, and Meiselman HJ.** Macromolecular depletion as a determinant of RBC adhesive interactions: why blood is thicker than water. *Biorheology* 51: 91-97, 2014.
266. **Neu B, and Meiselman HJ.** Red blood cell aggregation. In: *Handbook of hemorheology and hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC: IOS Press, 2007, p. 114 - 136.
267. **Neu B, Sowemimo-Coker SO, and Meiselman HJ.** Cell-cell affinity of senescent human erythrocytes. *Biophysical journal* 85: 75-84, 2003.
268. **Neu B, Wenby R, and Meiselman HJ.** Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation. *Biophysical journal* 95: 3059-3065, 2008.
269. **Neumann FJ, Katus HA, Hoberg E, Roebruck P, Braun M, Haupt HM, Tillmanns H, and Kubler W.** Increased plasma viscosity and erythrocyte aggregation: indicators of an unfavourable clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Br Heart J* 66: 425-430, 1991.
270. **Neumeister B, Grauer M, Koch M, Hornlein R, Dinkelmann S, Bernhard R, Haap M, and Northoff H.** [Effects of leukocyte depletion on the storage quality of whole blood]. *Anaesthesist* 46: 979-982, 1997.
271. **Nilsson L, Hedner U, Nilsson IM, and Robertson B.** Shelf-life of bank blood and stored plasma with special reference to coagulation factors. *Transfusion* 23: 377-381, 1983.
272. **Nordt FJ.** Hemorheology in cerebrovascular diseases: approaches to drug development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 416: 651-661, 1983.
273. **O'Donnell J, and Laffan MA.** The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med* 11: 343-351, 2001.
274. **Ong PK, Namgung B, Johnson PC, and Kim S.** Effect of erythrocyte aggregation and flow rate on cell-free layer formation in arterioles. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298: H1870-1878, 2010.
275. **Osei EN, Odoi AT, Owusu-Ofori S, and Allain JP.** Appropriateness of blood product transfusion in the Obstetrics and Gynaecology (O&G) department of a tertiary hospital in West Africa. *Transfusion medicine* 23: 160-166, 2013.
276. **Pantaleo A, Ferru E, Giribaldi G, Mannu F, Carta F, Matte A, de Franceschi L, and Turrini F.** Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated

by Syk kinase to form large membrane clusters in normal and G6PD-deficient red blood cells. *The Biochemical journal* 418: 359-367, 2009.

277. **Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, and Mann M.** In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 108: 791-801, 2006.

278. **Pearson MJ, and Lipowsky HH.** Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 279: H1460-1471, 2000.

279. **Peng Z, Li X, Pivkin IV, Dao M, Karniadakis GE, and Suresh S.** Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 13356-13361, 2013.

280. **Picker SM, Sturner SS, Oustianskaja L, and Gathof BS.** Leucodepletion leads to component-like storage stability of whole blood--suggesting its homologous use? *Vox sanguinis* 87: 173-181, 2004.

281. **Pirrelli A.** Arterial hypertension and hemorheology. What is the relationship? *Clinical hemorheology and microcirculation* 21: 157-160, 1999.

282. **Politsmakher A, Doddapaneni V, Seeratan R, and Dosik H.** Effective reduction of blood product use in a community teaching hospital: when less is more. *The American journal of medicine* 126: 894-902, 2013.

283. **Pries AR, Ley K, Claassen M, and Gaehtgens P.** Red cell distribution at microvascular bifurcations. *Microvasc Res* 38: 81-101, 1989.

284. **Pries AR, and Secomb TW.** Microcirculatory network structures and models. *Annals of Biomedical Engineering* 28: 916-921, 2000.

285. **Pries AR, Secomb TW, Gessner T, Sperandio MB, Gross JF, and Gaehtgens P.** Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circulation research* 75: 904-915, 1994.

286. **Puig-de-Morales-Marinkovic M, Turner KT, Butler JP, Fredberg JJ, and Suresh S.** Viscoelasticity of the human red blood cell. *American journal of physiology Cell physiology* 293: C597-605, 2007.

287. **Raat NJ, and Ince C.** Oxygenating the microcirculation: the perspective from blood transfusion and blood storage. *Vox sanguinis* 93: 12-18, 2007.

288. **Raat NJ, Verhoeven AJ, Mik EG, Gouwerok CW, Verhaar R, Goedhart PT, de Korte D, and Ince C.** The effect of storage time of human red cells on intestinal microcirculatory oxygenation in a rat isovolemic exchange model. *Critical care medicine* 33: 39-45; discussion 238-239, 2005.

289. **Radiometer-Medical-ApS.** Elektroden. In: *Referenzhandbuch der ABL700 Serie*. Brønshøj, Denmark: Radiometer Medical ApS.

290. **Raffael A, Nebe CT, and Valet G.** Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*, edited by Schmitz G, and Rothe G. Stuttgart: Schattauer, 1994, p. 3 - 49.

291. **Rainer C, Kawanishi DT, Chandraratna PA, Bauersachs RM, Reid CL, Rahimtoola SH, and Meiselman HJ.** Changes in blood rheology in patients with stable angina pectoris as a result of coronary artery disease. *Circulation* 76: 15-20, 1987.
292. **Ramplung MW.** Compositional Properties of Blood. In: *Handbook of Hemorheology*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Ramplung MW, and Meiselman HJ. Amsterdam, NL: IOS Press, 2007, p. 34-44.
293. **Ramplung MW, Meiselman HJ, Neu B, and Baskurt OK.** Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology* 41: 91-112, 2004.
294. **Ranney HM, and Sharma V.** Structure and function of hemoglobin In: *Williams Hematology*, edited by Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, and Seligsohn UMcGraw-Hill Professional, 2000.
295. **Ranucci M, Carlucci C, Isgro G, Boncilli A, De Benedetti D, De la Torre T, Brozzi S, and Frigiola A.** Duration of red blood cell storage and outcomes in pediatric cardiac surgery: an association found for pump prime blood. *Crit Care* 13: R207, 2009.
296. **Rapoport I, Berger H, Elsner R, and Rapoport S.** PH-dependent changes of 2,3-bisphosphoglycerate in human red cells during transitional and steady states in vitro. *European journal of biochemistry / FEBS* 73: 421-427, 1977.
297. **Rapoport S, and Wing M.** Dimensional, Osmotic, and Chemical Changes of Erythrocytes in Stored Blood. I. Blood Preserved in Sodium Citrate, Neutral, and Acid Citrate-Glucose (Acd) Mixtures. *J Clin Invest* 26: 591-615, 1947.
298. **Regan F, Teesdale P, Garner S, Callaghan T, Brennan M, and Contreras M.** Comparison of in vivo red cell survival of donations collected by Haemonetics MCS versus conventional collection. *Transfusion medicine* 7: 25-28, 1997.
299. **Reglin B, Secomb TW, and Pries AR.** Structural adaptation of microvessel diameters in response to metabolic stimuli: where are the oxygen sensors? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 297: H2206-2219, 2009.
300. **Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy JA, and Dormandy TL.** A simple method for measuring erythrocyte deformability. *Journal of clinical pathology* 29: 855-858, 1976.
301. **Relevy H, Koshkaryev A, Manny N, Yedgar S, and Barshtein G.** Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion* 48: 136-146, 2008.
302. **Riggert J.** [Improvement of the coagulation potential in whole blood through leukocyte depletion]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 35: 645-648, 2000.
303. **Roche-Diagnostics-GmbH.** 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG), UV-Test zur Bestimmung von 2,3-DPG in Blutproben im Rahmen von Forschungsstudien. Penzberg, Germany: 2004.
304. **Rolf-Greiner-BioChemica.** ATP Hexokinase. In: *Reagenz für die quantitative in vitro-Bestimmung von ATP in Blut und Erythrozytenkonzentraten mit der Hexokinase-Methode an photometrischen Systemen*Rolf Greiner BioiChemica, 2004.

305. **Roy TK, Pries AR, and Secomb TW.** Theoretical comparison of wall-derived and erythrocyte-derived mechanisms for metabolic flow regulation in heterogeneous microvascular networks. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 302: H1945-1952, 2012.
306. **Rubin O, Canellini G, Delobel J, Lion N, and Tissot JD.** Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 39: 342-347, 2012.
307. **Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, and Lion N.** Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 8 Suppl 3: s31-38, 2010.
308. **Sachs L, and Hedderich J.** *Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R.* . Springer Verlag, 2006.
309. **Sakai H, Okuda N, Sato A, Yamaue T, Takeoka S, and Tsuchida E.** Hemoglobin encapsulation in vesicles retards NO and CO binding and O2 release when perfused through narrow gas-permeable tubes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 298: H956-965, 2010.
310. **Sakr Y, Chierego M, Piagnerelli M, Verdant C, Dubois MJ, Koch M, Creteur J, Gullo A, Vincent JL, and De Backer D.** Microvascular response to red blood cell transfusion in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 35: 1639-1644, 2007.
311. **Salaria ON, Barodka VM, Hogue CW, Berkowitz DE, Ness PM, Wasey JO, and Frank SM.** Impaired red blood cell deformability after transfusion of stored allogeneic blood but not autologous salvaged blood in cardiac surgery patients. *Anesthesia and analgesia* 118: 1179-1187, 2014.
312. **Salomao M, Zhang X, Yang Y, Lee S, Hartwig JH, Chasis JA, Mohandas N, and An X.** Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8026-8031, 2008.
313. **Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, and Prohaska R.** Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* 99: 2569-2577, 2002.
314. **Salzer U, and Prohaska R.** Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 97: 1141-1143, 2001.
315. **Secomb TW.** Theoretical models for regulation of blood flow. *Microcirculation* 15: 765-775, 2008.
316. **Secomb TW, and Pries AR.** Basic Principles of Hemodynamics. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amstersam: IOS Press, 2007, p. 289 - 306.
317. **Secomb TW, and Skalak R.** A two-dimensional model for capillary flow of an asymmetric cell. *Microvasc Res* 24: 194-203, 1982.

318. **Sheetz MP, and Singer SJ.** On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of the spectrin complex. *The Journal of cell biology* 73: 638-646, 1977.
319. **Shevkoplyas SS, Yoshida T, Gifford SC, and Bitensky MW.** Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device. *Lab on a chip* 6: 914-920, 2006.
320. **Siemens-Healthcare-Diagnostics-Products-GmbH.** Thromborel® S, Arbeitsanleitung. Marburg, Deutschland: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, vormals Dade Behring Marburg GmbH, 2008.
321. **Silliman CC, Clay KL, Thurman GW, Johnson CA, and Ambruso DR.** Partial characterization of lipids that develop during the routine storage of blood and prime the neutrophil NADPH oxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 124: 684-694, 1994.
322. **Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tuder RM, Johnson JL, and Ambruso DR.** Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *The Journal of clinical investigation* 101: 1458-1467, 1998.
323. **Simchon S, Jan KM, and Chien S.** Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow. *The American journal of physiology* 253: H898-903, 1987.
324. **Simmonds MJ, Detterich JA, and Connes P.** Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell. *Biorheology* 51: 121-134, 2014.
325. **Sims PJ, and Wiedmer T.** Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* 86: 266-275, 2001.
326. **Solheim BG, Flesland O, Brosstad F, Mollnes TE, and Seghatchian J.** Improved preservation of coagulation factors after pre-storage leukocyte depletion of whole blood. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 29: 133-139, 2003.
327. **Solomon SB, Wang D, Sun J, Kaniyas T, Feng J, Helms CC, Solomon MA, Alimchandani M, Quezado M, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB, Klein HG, and Natanson C.** Mortality increases after massive exchange transfusion with older stored blood in canines with experimental pneumonia. *Blood* 121: 1663-1672, 2013.
328. **Somer T, and Meiselman HJ.** Disorders of blood viscosity. *Ann Med* 25: 31-39, 1993.
329. **Soutani M, Suzuki Y, Tateishi N, and Maeda N.** Quantitative evaluation of flow dynamics of erythrocytes in microvessels: influence of erythrocyte aggregation. *The American journal of physiology* 268: H1959-1965, 1995.
330. **Sparrow RL, and Patton KA.** Supernatant from stored red blood cell primes inflammatory cells: influence of prestorage white cell reduction. *Transfusion* 44: 722-730, 2004.
331. **Sparrow RL, Sran A, Healey G, Veale MF, and Norris PJ.** In vitro measures of membrane changes reveal differences between red blood cells stored in saline-adenine-glucose-mannitol and AS-1 additive solutions: a paired study. *Transfusion* 54: 560-568, 2014.

332. **Spinella PC, and Doctor A.** Role of transfused red blood cells for shock and coagulopathy within remote damage control resuscitation. *Shock* 41 Suppl 1: 30-34, 2014.
333. **Spinella PC, Sparrow RL, Hess JR, and Norris PJ.** Properties of stored red blood cells: understanding immune and vascular reactivity. *Transfusion* 51: 894-900, 2011.
334. **Spitalnik SL.** Stored red blood cell transfusions: iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfusion* 54: 2365-2371, 2014.
335. **Stefanovic M, Puchulu-Campanella E, Kodippili G, and Low PS.** Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. *The Biochemical journal* 449: 143-150, 2013.
336. **Steiner ME, Assmann SF, Levy JH, Marshall J, Pulkrabek S, Sloan SR, Triulzi D, and Stowell CP.** Addressing the question of the effect of RBC storage on clinical outcomes: the Red Cell Storage Duration Study (RECESS) (Section 7). *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 43: 107-116, 2010.
337. **Steiner ME, Ness PM, Assmann SF, Triulzi DJ, Sloan SR, Delaney M, Granger S, Bennett-Guerrero E, Blajchman MA, Scavo V, Carson JL, Levy JH, Whitman G, D'Andrea P, Pulkrabek S, Ortel TL, Bornikova L, Raife T, Puca KE, Kaufman RM, Nuttall GA, Young PP, Youssef S, Engelman R, Greilich PE, Miles R, Josephson CD, Bracey A, Cooke R, McCullough J, Hunsaker R, Uhl L, McFarland JG, Park Y, Cushing MM, Klodell CT, Karanam R, Roberts PR, Dyke C, Hod EA, and Stowell CP.** Effects of red-cell storage duration on patients undergoing cardiac surgery. *The New England Journal of Medicine* 372: 1419-1429, 2015.
338. **Strandenes G, De Pasquale M, Cap AP, Hervig TA, Kristoffersen EK, Hickey M, Cordova C, Berseus O, Eliassen HS, Fisher L, Williams S, and Spinella PC.** Emergency whole-blood use in the field: a simplified protocol for collection and transfusion. *Shock* 41 Suppl 1: 76-83, 2014.
339. **Strumia MM, Blake AD, Jr., and Wicks WA.** The preservation of whole blood. *J Clin Invest* 26: 667-671, 1947.
340. **Sugiura T, Kouwaki M, Goto K, Endo T, Ito K, Koyama N, and Togari H.** Effects of exchange transfusion on cytokine profiles in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Int* 54: 931-933, 2012.
341. **Sutera SP, Gardner RA, Boylan CW, Carroll GL, Chang KC, Marvel JS, Kilo C, Gonen B, and Williamson JR.** Age-related changes in deformability of human erythrocytes. *Blood* 65: 275-282, 1985.
342. **Sysmex-Medical-Electronics-GmbH.** Bedienungsanleitung Sysmex K-1000 Hämatologie-System. Norderstedt: Sysmex Medical Electronics GmbH Deutschland.
343. **Tateishi N, Suzuki Y, Cicha I, and Maeda N.** O₂ release from erythrocytes flowing in a narrow O₂-permeable tube: effects of erythrocyte aggregation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 281: H448-456, 2001.

344. **Terpstra V, and van Berkel TJ.** Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood* 95: 2157-2163, 2000.
345. **Thomas L.** Fibrinogen. In: *Labor und Diagnose*, edited by Thomas L. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 2012, p. 1021-1026.
346. **Thomas L.** *Labor und Diagnose*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 2008.
347. **Thomas L.** Natrium. In: *Labor und Diagnose*, edited by Thomas L. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 2008, p. 422-423.
348. **Thurston GB, and Henderson NM.** Viscoelasticity of Human Blood. In: *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, edited by Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW, and Meiselman HJ. Amsterdam: IOS Press, 2007, p. 72 - 90.
349. **Tinmouth A, Fergusson D, Yee IC, and Hebert PC.** Clinical consequences of red cell storage in the critically ill. *Transfusion* 46: 2014-2027, 2006.
350. **Trautschold I, Lamprecht W, and Schweitzer G.** Adenosine 5'-Triphosphate. In: *Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis* VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1989, p. 346-357.
351. **Tsai AG, Acero C, Nance PR, Cabrales P, Frangos JA, Buerk DG, and Intaglietta M.** Elevated plasma viscosity in extreme hemodilution increases perivascular nitric oxide concentration and microvascular perfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1730-1739, 2005.
352. **Tsai AG, Cabrales P, and Intaglietta M.** Microvascular perfusion upon exchange transfusion with stored red blood cells in normovolemic anemic conditions. *Transfusion* 44: 1626-1634, 2004.
353. **Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, Acharya SA, Winslow RM, and Intaglietta M.** Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood* 108: 3603-3610, 2006.
354. **Tsai AG, Friesenecker B, and Intaglietta M.** Capillary flow impairment and functional capillary density. *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 238-243, 1995.
355. **Tsai AG, Hofmann A, Cabrales P, and Intaglietta M.** Perfusion vs. oxygen delivery in transfusion with "fresh" and "old" red blood cells: the experimental evidence. *Transfus Apher Sci* 43: 69-78, 2010.
356. **Turner S, Williams AR, and Rees JM.** The role of mean corpuscular haemoglobin concentration in limiting the storage life of human blood. *Vox sanguinis* 52: 177-181, 1987.
357. **Tuvia S, Levin S, Bitler A, and Korenstein R.** Mechanical fluctuations of the membrane-skeleton are dependent on F-actin ATPase in human erythrocytes. *The Journal of cell biology* 141: 1551-1561, 1998.
358. **Tuvia S, Levin S, and Korenstein R.** Correlation between local cell membrane displacements and filterability of human red blood cells. *FEBS letters* 304: 32-36, 1992.

359. **Uzoigwe C.** The human erythrocyte has developed the biconcave disc shape to optimise the flow properties of the blood in the large vessels. *Med Hypotheses* 67: 1159-1163, 2006.
360. **Vandromme MJ, McGwin G, Jr., and Weinberg JA.** Blood transfusion in the critically ill: does storage age matter? *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 17: 35, 2009.
361. **Vaya A, Camara R, Hernadez-Mijares A, Romagnoli M, Sola E, Corella D, and Laiz B.** Erythrocyte deformability in morbid obesity before bariatric surgery. Influence of abdominal obesity. *Clin Hemorheol Microcirc* 46: 313-320, 2010.
362. **Verhoeven AJ, Hilarius PM, Dekkers DW, Lagerberg JW, and de Korte D.** Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity. *Vox sanguinis* 91: 244-251, 2006.
363. **Vicaute E.** Opposite effects of red blood cell aggregation on resistance to blood flow. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 36: 361-368, 1995.
364. **Villela NR, Cabrales P, Tsai AG, and Intaglietta M.** Microcirculatory effects of changing blood hemoglobin oxygen affinity during hemorrhagic shock resuscitation in an experimental model. *Shock* 31: 645-652, 2009.
365. **Vlaar AP, de Korte D, and Juffermans NP.** The aged erythrocyte: key player in cancer progression, but also in infectious and respiratory complications of blood transfusion? *Anesthesiology* 111: 444, 2009.
366. **von Bormann B.** Klinische Aspekte der Therapie mit Erythrozyten, "Lessons learned" von den Zeugen Jehovas? *Der Anaesthetist* 56: 380-384, 2007.
367. **von Bormann B, Wirtz S, Weiler J, von Bormann C, and Trobisch H.** [Quality of whole blood as a result of storage and preparation (inline-leukocyte depletion). Evidence for autologous predeposit]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 35: 326-332, 2000.
368. **von Bormann B, Wirtz S, Weiler J, von Bormann C, and Trobisch H.** [Quality of whole blood as a result of storage and preparation (inline-leukocyte depletion). Evidence for autologous predeposit]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 35: 326-332, 2000.
369. **Wagner GM, Chiu DT, Qiu JH, Heath RH, and Lubin BH.** Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. *Blood* 69: 1777-1781, 1987.
370. **Walsh TS.** Is stored blood good enough for critically ill patients? *Crit Care Med* 33: 238 - 239, 2005.
371. **Walsh TS, McArdle F, McLellan SA, Maciver C, Maginnis M, Prescott RJ, and McClelland DB.** Does the storage time of transfused red blood cells influence regional or global indexes of tissue oxygenation in anemic critically ill patients? *Critical care medicine* 32: 364-371, 2004.
372. **Wang D, Sun J, Solomon SB, Klein HG, and Natanson C.** Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion* 52: 1184-1195, 2012.

373. **Wang X, Zhao H, Zhuang FY, and Stoltz JF.** Measurement of erythrocyte deformability by two laser diffraction methods. *Clinical hemorheology and microcirculation* 21: 291-295, 1999.
374. **Waschke KF, and Frietsch T.** [Hemoglobin solutions]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 35: 767-770, 2000.
375. **Weed RI, LaCelle PL, and Merrill EW.** Metabolic dependence of red cell deformability. *The Journal of clinical investigation* 48: 795-809, 1969.
376. **Weinberg JA, McGwin G, Jr., Griffin RL, Huynh VQ, Cherry SA, 3rd, Marques MB, Reiff DA, Kerby JD, and Rue LW, 3rd.** Age of transfused blood: an independent predictor of mortality despite universal leukoreduction. *The Journal of trauma* 65: 279-282; discussion 282-274, 2008.
377. **Weinberg JA, McGwin G, Jr., Marques MB, Cherry SA, 3rd, Reiff DA, Kerby JD, and Rue LW, 3rd.** Transfusions in the less severely injured: does age of transfused blood affect outcomes? *The Journal of trauma* 65: 794-798, 2008.
378. **Werre JM, Willekens FL, Bosch FH, de Haans LD, van der Vegt SG, van den Bos AG, and Bosman GJ.** The red cell revisited--matters of life and death. *Cellular and molecular biology* 50: 139-145, 2004.
379. **Whittaker SR, and Winton FR.** The apparent viscosity of blood flowing in the isolated hindlimb of the dog, and its variation with corpuscular concentration. *The Journal of physiology* 78: 339-369, 1933.
380. **Wiebecke D, Fischer K, Keil G, Leibling R, Reissigl H, and Stangel W.** Zur Geschichte der Transfusionsmedizin in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts (unter der besonderen Berücksichtigung ihrer Entwicklung in Deutschland). *Transfus Med Hemother* 31: 12-31, 2004.
381. **Wikipedia.** Durchflusszytometrie.
382. **Wikipedia.** Fas-Rezeptor.
383. **Wikipedia.** Fenton-Reaktion.
384. **Willekens FL, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, Bos HJ, Bosman GJ, van den Bos AG, Verkleij AJ, and Werre JM.** Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood* 101: 747-751, 2003.
385. **Willekens FL, Werre JM, Groenen-Dopp YA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, de Pauw B, and Bosman GJ.** Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *British journal of haematology* 141: 549-556, 2008.
386. **Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, van den Bos AG, Bosman GJ, and van Berkel TJ.** Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 105: 2141-2145, 2005.
387. **Wolfe LC.** The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion* 25: 185-203, 1985.

388. **Wolfe LC, Byrne AM, and Lux SE.** Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank-stored red cells. Abnormal spectrin-protein 4.1-actin complex formation. *J Clin Invest* 78: 1681-1686, 1986.
389. **Wood L, and Beutler E.** The viability of human blood stored in phosphate adenine media. *Transfusion* 7: 401-408, 1967.
390. **Yalcin O, Meiselman HJ, Armstrong JK, and Baskurt OK.** Effect of enhanced red blood cell aggregation on blood flow resistance in an isolated-perfused guinea pig heart preparation. *Biorheology* 42: 511-520, 2005.
391. **Yalcin O, Ortiz D, Tsai AG, Johnson PC, and Cabrales P.** Microhemodynamic aberrations created by transfusion of stored blood. *Transfusion* 54: 1015-1027, 2014.
392. **Yalcin O, Ulker P, Yavuzer U, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Nitric oxide generation by endothelial cells exposed to shear stress in glass tubes perfused with red blood cell suspensions: role of aggregation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 294: H2098-2105, 2008.
393. **Yalcin O, Uyuklu M, Armstrong JK, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Graded alterations of RBC aggregation influence in vivo blood flow resistance. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 287: H2644-2650, 2004.
394. **Yedgar S, Hovav T, and Barshtein G.** Red blood cell intercellular interactions in oxidative stress states. *Clinical hemorheology and microcirculation* 21: 189-193, 1999.
395. **Yedgar S, Koshkaryev A, and Barshtein G.** The red blood cell in vascular occlusion. *Pathophysiol Haemost Thromb* 32: 263-268, 2002.
396. **Zhang ZW, and Neu B.** Role of macromolecular depletion in red blood cell adhesion. *Biophysical journal* 97: 1031-1037, 2009.
397. **Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, and Hayoz D.** Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 32: 351-355, 1998.
398. **Zielinski MD, Jenkins DH, Hughes JD, Badjie KS, and Stubbs JR.** Back to the future: the renaissance of whole-blood transfusions for massively hemorrhaging patients. *Surgery* 155: 883-886, 2014.
399. **Zijlstra WG.** Syllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells. *Netherlands society for physiology and pharmacology* 8: 153-154, 1957.
400. **Zimrin AB, and Hess JR.** Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. *Vox sanguinis* 96: 93-103, 2009.

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adam, Adamkiewicz, Aigner, Albert, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Berger, Berhard, Beyer, Bien, Blaser, Bock, Boekhoff, Boudriot, Bozinov, Breit, Büch, Burghard, Celik, Cetin, Christiansen, Czubayko, Dauch, Dietrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Eggert, Eilers, Ellenrieder, Fensterer, Feuser, Funck, Gaubatz, Gecks, Gerdes, Geus, Gotzen, Gress, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hadji, Hamer, Hasilik, Hellwig, Herrmann-Lingen, Hörle, Hofmann, Hoffmann, Jackisch, Jackowski-Dohrmann, Jerrentrup, Jungclas, Kalder, Kanngießer, Karger, Kill, Kim-Berger, Klaus, Klingmüller, Klose, Klug, Kömhoff, Koolman, Kowalski, Krause, Krebber, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lemansky, Lenz, Leonhardt, Lill, Löffler, v. Löw, Lohoff, Lutz, Maier, Maisch, Mandrek, Meißner, Mennel, Meyer, Möller, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nurwakagari, Oertel, Pagenstecher, Plant, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Roelle, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schepelmann, Schmidt, Schmidt, Schnabel, Schrader, Seitz, Sekundo, Slater, Slonka, Sommer, Steiniger, Stief, Stiletto, Stiller, Strempel, Studer, Sure, Suske, Teymoortash, Urich, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Wahl, Waldegger, Weihe, Weiler, Welter, Wennemuth, Werner, Weske, Westermann, Westphal, Wilke, Wrocklage, Wulf, Zemlin.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Volker Kretschmer, emeritierter Direktor des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Überlassung des Themas, sein mir entgegengebrachtes Vertrauen und für seine Ratschläge bei der Konzeption und der Durchführung der Studie.

Mein besonderer und sehr herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ralf Karger, M. Sc., Facharzt für Transfusionsmedizin in der Gerinnungsambulanz Duisburg, vormals leitender Oberarzt im Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg, für seine fürsorgliche Betreuung, seine ausführliche Beantwortung meiner Fragen, für seine Geduld, sein mir entgegengebrachtes Vertrauen und für seine Motivationshilfen.

Frau Sonja Cappeller, Frau Christa Hagenbach und Herrn Benjamin Linder danke ich für ihre Unterstützung bei den laborchemischen Untersuchungen sowie für ihre fachlichen Ratschläge und für die gute und angenehme Zusammenarbeit.

Im Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Blutspendelabors des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg für die gute Betreuung der Blutspender und die Weiterverarbeitung der gesammelten Blutkonserven. Sämtlichen weiteren Mitarbeitern des Zentrums für Transfusionsmedizin danke ich für die gute Zusammenarbeit und die mir zuteilgewordene Unterstützung.

Allen Blutspendern, die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereiterklärt haben, danke ich sehr. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Max R. Hardeman, Department of Physiology, Academic Medical Center, University of Amsterdam (Amsterdam, Niederlande) danke ich für seine wissenschaftlichen Ratschläge und seine Erklärungen und Hinweise bezüglich des LORCA™.

Weiterer Dank gilt der Firma MacoPharma, (Langen, Deutschland) für die Bereitstellung der ABC®-MacoPharma-Waage sowie der Blutbeutelssysteme. Frau Karin Röder (Regional-Verkaufsleiterin Transfusion, MacoPharma) und Herrn Dr. Hans Joachim Rieger (Produktmanager Transfusion, MacoPharma) danke ich für ihre Unterstützung und

Beantwortungen sämtlicher die ABC-Waage betreffender Fragen sowie für die Überlassung von Informationsmaterial.

Zudem danke ich all denjenigen, die mich mit emotionaler Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet haben.